©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Die Vakuolen der Desmidiaceen, ihr Verhalten bei Vitalfärbe- und Zentrifugierungsversuchen

Von Oswald Kiermayer

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 23 Textabbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung am 8. Oktober 1953)

Einleitung.

Die Desmidiaceen gehören neben anderen Süßwasseralgen zu den beliebtesten Versuchsobjekten der Algenforscher. Sie stellen heute eine in systematisch-morphologischer Hinsicht überaus gut bearbeitete Gruppe dar. Ihre zellphysiologische Erforschung lag jedoch viele Jahre hindurch noch recht im argen. Erst in jüngerer Zeit, vor allem seit Cholnoky und Höfler (1950) darauf hinwiesen, daß Hochmooralgen ein ausgezeichnetes Material für vergleichend zellphysiologische Studien darstellen, werden die Desmidiaceen nun auch einem intensiven zytologisch-physiologischen Studium unterworfen.

Schon früh erweckten die Gipskristalle der Endvakuolen von Closterien die Aufmerksamkeit der Forscher. Mit diesen beschäftigten sich de Bary (1858), Fischer (1884), Steinecke (1926) und vor allem Kopetzky-Rechtperg (1931). Letzterer untersuchte auch ausführlich die von Nägeli (1849), de Bary (1858), Löw (1878) und Fischer (1884) beschriebenen „Zersetzungskörperchen", die häufig bei Pleurotaenien und anderen Desmidiaceen-Gattungen auftreten, und schlägt statt Zersetzungskörperchen den Ausdruck „Gallertkörperchen" vor.

Über die Zellwand mit ihrem Porenapparat liegen ausführliche Arbeiten von Hauptfleisch (1888), Lütkemüller (1894, 1902, 1917) und von van Wisselingh (1912) vor. Mit den Gallerten, die Krieger nach ihrer Funktion in Hüll-, Bewegungs-, Befestigungs- und Verbindungsgallerten einteilt, beschäftigten sich weiters Klebs (1885, 1887), Lütkemüller (1902), Schröder (1902), Hauptfleisch (1888) und Kol (1927). Höfler (1926) beschreibt lokale Eisenspeicherung in der Zellwand der Desmidiaceen. Kinzel (1953) berichtet ausführlich

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

über die Chemie und Physikochemie der Gallertbildung von Süßwasseralgen, und Höfler und Schindler (1952) beschreiben das Verhalten der Algengallerten bei Vitalfärbung.

Untersuchungen über die Plastiden der Desmidiaceen führten Lütkemüller (1883), Lutman (1910, 1911), West (1916) und besonders Carter (1919 und 1920) durch. Weber (1937), Küster (1937) und Menke (1934) untersuchten an Closterien die Doppelbrechung der Chloroplasten. Eibl (1939 a, 1939 c, 1941) führte Zentrifugierungsversuche an *Micrasterias rotata* durch, wobei er vor allem die Restitution des zentrifugal verlagerten Chloroplasten ausführlich beschreibt. Unter anderem zeigt er, daß allein das strömende Zytoplasma den Chloroplasten wieder zu seiner normalen Gestalt ausspannt, der Chloroplast selbst sich dabei vollkommen passiv verhält. Er konnte weiter zeigen, daß die Form der Plastiden im entscheidenden Maße vom Protoplasma bestimmt wird. Vor Eibl stellte schon Andrews (1915) bei Zentrifugierungsversuchen an *Closterium moniliferum* fest, daß sich der Chloroplast zentrifugal verlagert und nach einiger Zeit sich wieder rückverlagern kann. Andrews beschreibt außerdem schaumige Plasmastrukturen, die durch das Zentrifugieren deutlich sichtbar werden. Jüngst berichtete Krebs (1951) über die Plastidenkonsistenz verschiedener Desmidiaceen-Arten.

Über die Protoplasmatik der Desmidiaceen liegen Arbeiten von Wills (1880) und Schumann (1875), die über die Plasmabewegung bei *Closterium lunula* berichten, vor. Kopetzky-Rechtperg (1932, 1938) beschreibt bei *Netrium digitus* streifenförmige Verdickungen des Wandplasmas. Krebs (1951, 1952) bestimmt bei einer großen Anzahl von Desmidiaceen-Arten den osmotischen Wert und die Permeabilität für Nichtleiter. Höfler (1951) behandelt Desmidiaceenproben mit hypertonischen Sodalösungen und stellt fest, daß sie normal plasmolysieren und oft tagelang ihren Protoplasten intakt behalten, während Gewebszellen von Blütenpflanzen gegenüber Sodalösungen bedeutend empfindlicher sind und sehr bald Tonoplastenstadien liefern. Loub (1951) stellte bei Resistenzversuchen mit Algen gegenüber Vitalfarbstoffen unter anderem fest, daß die *Mesotaeniales* (*Netrium* und *Cylindrocystis*) gegenüber den *Desmidiales* bedeutend empfindlicher sind. Unter den Desmidiales zeigte sich lediglich *Closterium lunula* gegenüber Farbstoffen stark empfindlich.

Über die Vakuolen der Desmidiaceen ist bisher noch wenig bekannt. Barg (1942) findet zwischen den Leisten des Chloroplasten von *Closterium moniliferum* eine große Anzahl von eirunden oder kugeligen Vakuolen, die am unbehandelten Material

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

sehr gut sichtbar sind, und Höfler (1942) beobachtet an *Pleurotaenium nodulosum* eine Unterteilung des zentralen Vakuoms in einzelne „Wabenkammern".

Grundlegend Neues über die Vakuolen der Desmidiaceen brachten Vitalfärbestudien. Cholnoky und Höfler (1950) stellten fest, daß basische Farbstoffe, wie Neutralrot oder Neutralviolett, bei entsprechendem p_H-Wert die Zellsäfte überaus deutlich anfärben. Hierbei ließ sich beobachten, daß die Endvakuolen von *Closterium libellula* stets stark und, gegenüber dem übrigen Zellsaft, metachromatisch verschieden gefärbt waren. Nach längerer Färbedauer trat bei den meisten Zellen eine Vakuolenkontraktion, verbunden mit einer starken Vakuolenzerschnürung, ein.

Nach Cholnoky Höfler unterscheidet diese sich jedoch wesentlich von der Vakuolenkontraktion, wie sie Küster (1926) und Weber (1930) an Zellen von Gewebepflanzen feststellten: Während bei letzteren das Plasma stets stark aufquillt, kann bei Algenzellen keine sichtbare Plasmaquellung festgestellt werden, „sondern die mikroskopische Beobachtung spricht für die Annahme, daß die Vakuolenwände bei den Algen sich vom Plasmawandbelag lösen und daß farblose Flüssigkeit den Raum zwischen Tonoplasten und Wandplasma einnimmt". Somit stellt die Vakuolenkontraktion der Desmidiaceen ein, in gewisser Hinsicht grundsätzlich neues zytologisches Phänomen dar Jüngst konnte Hirn (1953) bei Vitalfärbeversuchen mit Toluidinblau und Brillantkresylblau feststellen, daß der Großteil der Desmidiaceenarten die beiden Farbstoffe mit violettem Farbton speichert, eine kleine Gruppe von Algen dagegen, zu der die Cosmarien vom *Cosmarium-cucurbita*-Typ gehören, im Plasma grünblaue Kügelchen erkennen lassen. Hirn konnte weiter zeigen, daß sich die Arten mit violetter Inhaltsfärbung erst im hochalkalischen Bereich, das heißt oberhalb des Umschlagspunktes der Farbstoffe, anfärben, während die Arten vom *Cosmarium-cucurbita*-Typ sowie *Cylindrocystis Brebissonii* den Farbstoff auch schon aus stark dissoziierten Farblösungen speichern. Ähnliches hatten Höfler und Schindler (1951) bei Vitalfärbeversuchen mit Toluidinblau in gestufter Wasserstoffionenkonzentration gefunden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sollen Untersuchungen über die Vakuolen der Desmidiaceen und deren Verhalten bei Zentrifugierung und bei Vitalfärbung sein. In einem Kapitel wird auch über Vitalfärbeversuche an vorher zentrifugierten Zellen berichtet werden.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Es sei gestattet, dem Vorstand des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Wien, meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Dr. Karl Höfler, für die Anregung zu dieser Arbeit und die ständige Hilfe und Unterstützung meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Material und Methodik.

Das für meine Versuche verwendete Material stammte aus den verschiedensten österreichischen Hochmooren. Vor allem waren es Algenproben aus der Ramsau bei Schladming am Südfuße des Dachsteins[1]. Von diesen sind das Hochmoor in der Nähe des Gasthauses Karlwirt, kurz RMK (Ramsauer Moor beim Karlwirt)[2] genannt, und das Heimerlmoor, als RT (Ramsauer Torfmoor)[1] bezeichnet, die ergiebigsten Algenfundorte.

Überaus reiches Algenmaterial stammte ferner aus Hochmooren bei Tamsweg im Lungau. Hier dehnen sich nördlich der Straße Tamsweg—Sauerfeld große Moorkomplexe aus. Anläßlich einer algenökologisch-soziologischen Exkursion, die Dr. W. Loub, Dr. W. Url, Dr. K. Hilmbauer, A. Diskus und O. Kiermayer im Sommer 1952 in dieses Gebiet unternahmen, wurden besonders die Moore in der Umgebung der Überlingalm einer genauen Untersuchung unterzogen (Loub 1953). Es stellte sich heraus, daß die dortigen Moore und Schlenkenkomplexe alle Übergänge vom Flach- zum Zwischenmoor und schließlich zum extrem sauren Hochmoor zeigen und daß jedes der Moore eine für sich charakteristische Algengesellschaft beherbergt. Diesem günstigen Umstand war es zu verdanken, daß die dort gesammelten Algenproben überaus artenreich waren. Auch in Österreich seltene Desmidiaceen-Arten, wie *Micrasterias americana* und *Docidium undulatum*, konnten in den dortigen Mooren oft massenhaft vorgefunden werden.

Bestes Versuchsmaterial stand mir ferner aus Mooren bei Karlstift[3] im Waldviertel zur Verfügung. Die von dort stammenden Algenproben zeichnen sich vor allem durch ihren ungemeinen Individuenreichtum aus. Besonders *Micrasterias rotata, M. denticulata, M. Thomasiana* var. *notata* und das große *Closterium lunula* waren massenhaft und vielfach rein vertreten. Die genannten Arten bildeten in den Algenfläschchen, in denen sie weiterkultiviert

[1] Legit Prof. Dr. K. Höfler, Doz. Dr. H. Schindler, Dr. I. Krebs. Vgl. Höfler-Schindler (1951); die Kartenskizze bei Cholnoky-Schindler (1951); Krebs (1951); Höfler (1953).

[3] Legit Frl. cand. phil. T. Tollerian.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

wurden, oberhalb oder auch unterhalb der Detritusschicht eine, oft mehrere Millimeter dicke grüne Lage, von der sich aus nach oben zu kleine „Algenbäumchen" bildeten. Solche Algenbäumchen sind sehr leicht mit der Pipette aufzusaugen und stellen dann ein ideales, vollkommen detritusfreies Versuchsmaterial dar.

Das Aufsammeln der Algenproben im Moor geschah auf die Weise, daß die meist schon mit freiem Auge am Grunde der seichten Schlenken sichtbare grüne Algenlage mittels eines großen Löffels vorsichtig abgehoben und, mit reichlich Standortswasser versehen, in ein Algenfläschchen von 50 bis 100 ccm gebracht wurde. Die Algenfläschchen wurden sorgfältig etikettiert und gut verschlossen nach Wien gebracht. Dort wurden sie zum Teil in den großen Nord- und Südfenstern des Pflanzenphysiologischen Institutes oder im Fließwasserbecken des Glashauses aufgestellt. Um der Luft freien Zutritt zu gewähren, durften die Korkstöpsel nur lose aufgelegt werden. Es wurde ferner stets darauf geachtet, daß die Algenfläschchen nie einer zu starken Sonnenbestrahlung ausgesetzt waren, wodurch die Temperatur des Standortswassers hätte erhöht oder die Assimilationstätigkeit der Algen unnatürlich gesteigert werden können.

Für die nachfolgenden Zentrifugierungsversuche kam eine elektrische Zentrifuge mit einer Maximaltourenzahl von 2500 bis 3000 Umdrehungen pro Minute zur Verwendung. Auf ihr war die Geschwindigkeit mittels eines Drehwiderstandes regulierbar; die jeweilige Tourenzahl auf einem Tourenzähler abzulesen. Während die Zentrifugierungsdauer bei den Versuchen von Objekt zu Objekt verschieden gewählt werden mußte, betrug die Tourenzahl stets 2500 Umdrehungen pro Minute.

Als Vitalfarbstoffe kamen vor allem Neutralrot, Neutralviolett, Toluidinblau und Brillantkresylblau zur Verwendung. Da es galt, eine Zellsaftfärbung zu erzielen, mußten die Farbstoffe in einer durch das Plasma leicht permeierfähigen Form geboten werden. Dies ist bekanntlich dann der Fall, wenn der Farbstoff molekular vorliegt. Die basischen Farbstoffe sind im sauren Bereich dissoziiert, im basischen Bereich dagegen in Form von Molekülen vorhanden. Neutralrot und Neutralviolett konnten dank ihres niederen Umschlagspunktes schon im Wiener Leitungswasser (p_H um 7,8) gelöst verwendet werden. Dagegen mußten Toluidinblau und Brillantkresylblau, die einen viel höheren Umschlagspunkt haben, in Pufferlösungen zur Verwendung kommen. Als Puffer dienten Phosphatpuffer in den üblichen Gewichts- und Mischungsverhältnissen. Die Farbstoffkonzentration war bei den einzelnen Versuchen verschieden. Bei sehr empfindlichen Objekten

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

kam der Farbstoff meist in einer Verdünnung von 1 10.000, bei resistenteren Objekten dagegen auch bei 1 2500 bis 1 : 5000 zur Verwendung.

Die Färbung der Algen wurde in der von Cholnoky und Höfler (1950) angegebenen Art durchgeführt: Die mittels einer Pipette aus dem Algenfläschchen entnommene, möglichst detritusfreie Probe wurde auf einen Objektträger gebracht und mit einem Streifen Filtrierpapier das für Färbeversuche schädliche Moorwasser gründlichst abgesaugt. Darauf wurde die Probe mit einem großen Tropfen der jeweiligen Farblösung versetzt und je nach Versuch 3 bis 10 Minuten stehengelassen. Nach dieser Zeit wurde die überschüssige Farblösung wieder abgesaugt, das Präparat mittels eines Deckglases bedeckt und die mikroskopische Beobachtung begonnen. Bei Präparaten mit wenig oder gar keinem Detritus erwies es sich als vorteilhaft, nach der Einfärbung die Farblösung gründlich abzusaugen und an ihre Stelle farblose Pufferlösung (bzw. Leitungswasser bei Einfärbung mit Neutralrot oder Neutralviolett) zuzugeben.

Dies hat den Vorteil, daß durch überschüssige Farblösung keine Überfärbung und damit Schädigung des Versuchsmaterials eintreten kann. Bei Präparaten mit reichlich Detritus ist das Durchsaugen einer reinen Pufferlösung nicht unbedingt notwendig, da der Großteil des überschüssigen Farbstoffes von den Detritusteilchen gebunden wird und es dadurch zu keiner Überfärbung der Algen kommen kann. Auch bei den später beschriebenen Versuchen über Entfärbeerscheinungen durfte aus methodischen Gründen die überschüssige Farblösung nicht durch eine reine Pufferlösung ersetzt werden.

Die mikroskopische Untersuchung der gefärbten Präparate erfolgte stets bei Tageslicht ohne jede Filterung. Die während der Untersuchung gemachten Beobachtungen wurden mit genauer Zeitangabe protokolliert. Die Zeichnungen wurden auf Grund genauer mikrometrischer Abmessungen hergestellt.

Die Vakuolen der Desmidiaceen sind an lebenden, unbeeinflußten Zellen ihres farblosen Zellsaftes wegen nur schwer feststellbar. Außerdem besitzt jede Zelle noch einen oft mächtigen und kompliziert gebauten Chloroplasten, der bei mikroskopischer Betrachtung die Vakuolenverhältnisse weitgehendst undeutlich macht. So sind wir also, wenn wir über Größe und Lage der

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Vakuolen Klarheit haben wollen, gezwungen, entweder ideal günstige Zellen, d. h. solche mit schwach ausgebildeten Plastiden, zu untersuchen oder die Zellen von außen her zu beeinflussen. Letzteres kann entweder durch Färbung der Vakuolen mittels Vitalfarbstoffen oder auch durch Zentrifugierung der Zellen, wobei sich der Chloroplast zentrifugal verlagert und die Vakuolenräume sichtbar werden, geschehen. Freilich muß man aber stets darauf bedacht sein, daß bei genannten Methoden, auch wenn sie noch so schonend angewendet werden, Veränderungen der Vakuolen gegenüber denen von unbeeinflußten Zellen auftreten, die uns dann Anlaß zu falschen Schlüssen geben könnten. Man kann daher aus Vitalfärbe- bzw. Zentrifugierungsbildern nur mit Vorsicht auf die tatsächlichen Verhältnisse bei unbeeinflußten Zellen schließen.

Einige Vertreter der Gattung *Closterium* und *Pleurotaenium* offenbaren uns jedoch schon vollkommen unbeeinflußt ihren Vakuolenbau. So erkennt man bei den großen *Closterium*-Arten (*Cl. lunula, Cl. libellula*) neben den in der Literatur wegen ihrer Kristalle so oft beschriebenen „Endvakuolen" auch noch eine größere Anzahl von Vakuolen zwischen den Leisten des rippenwalzenförmigen Chloroplasten (vgl. Barg 1942 bei *Cl. Ehrenbergii*). Diese Vakuolen sind in den Polen der Zelle, also dort, wo der Raum zwischen den Chloroplastenleisten sehr eng ist, nur klein, werden jedoch gegen die Zellmitte zu, wo die Zwischenräume der Chloroplastenleisten bedeutend geräumiger sind, immer größer. Die Form und Gestalt der Chloroplastenleisten wird durch diese Vakuolen bestimmt. Die Vakuolen sind voneinander durch feine, vollkommen hyaline, mikrosomenfreie und nicht strömende Plasmalamellen getrennt. Diese plasmatischen Vakuolenwanderungen unterscheiden sich vom wandständigen, stark strömenden und durch viele Mikrosomen deutlich granulierten Plasma sehr wesentlich. Die einzelnen Vakuolen liegen bei ungeschädigten Zellen so eng nebeneinander, daß zwischen ihnen kein Raum frei bleibt. Sie verkleinern sich dagegen bei pathologischen Veränderungen der Zelle, werden kugelig oder elliptisch und isolieren sich voneinander (Tonoplastenbildung). Die Chloroplastenleisten passen sich in solchen Fällen den abgerundeten Vakuolen an und nehmen einen wellig gewundenen Verlauf. Außer in den Endvakuolen konnte ich sehr häufig auch in den Vakuolen zwischen den Chloroplastenleisten Kristalle vorfinden. In kleinen Vakuolen lag meist nur ein Kristall, in den größeren dagegen häufig auch mehrere.

Bei *Pleurotaenium truncatum* und *Pl. Ehrenbergii* ist das zentrale Vakuom ebenso wie bei *Pleurotaenium nodulosum*

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

(Czurda 1937, Höfler 1942, 1951) in einzelne große Wabenkammern gegliedert. Ich möchte den von Höfler für die zentralen Vakuolen von *Pleurotaenium nodulosum* verwendeten Ausdruck „Wabenkammern" oder „Wabenvakuolen" auch bei meinen Arbeiten weiterhin verwenden. Diese sind meist von rechteckiger Gestalt und voneinander ebenso wie die Wabenvakuolen der beschriebenen Closterien nur durch feine, hyaline Plasmalamellen getrennt. Zu dem System der zentralen Wabenvakuolen stehen auch die beiden Endvakuolen in Beziehung. Sie unterscheiden sich äußerlich von den zentralen Wabenvakuolen nur durch ihre stets runde Gestalt und den Gehalt an großen, prismenförmigen, untereinander oft zu einem Klumpen verklebten Kristallen (Kopetzky-Rechtperg 1931). Außer diesen Vakuolen läßt sich aber knapp über, zwischen oder unterhalb der peripheren Chloroplastenbänder ein System von kleinen, mehr oder minder polygonalen Vakuolen erkennen. Man kann daher an *Pleurotaenium truncatum* und *Pl. Ehrenbergii* innerhalb einer Zelle zweierlei untereinander zusammenhängende Vakuolensysteme feststellen: Ein zentrales System von großen, nahezu rechteckigen Kammern, in welches auch die runden Endvakuolen mit einbezogen sind, und ein peripheres System, bestehend aus kleinen polygonalen Wabenvakuolen. Diese Anordnung der Vakuolen ist für den inneren Bau der Zellen sehr vorteilhaft: Durch den Turgordruck der zentralen Vakuolen werden die Chloroplastenbänder wandwärts gedrückt. Diesem Druck von innen wirken die peripheren Wabenvakuolen oberhalb der Chloroplastenbänder entgegen. Auf diese Weise liegen diese zwischen den zentralen und den peripheren Wabenvakuolen elastisch eingebettet und werden von letzteren zu ihrer bandförmigen Gestalt mit relativ großer Oberfläche plattgedrückt.

Am 30. Jänner 1952 untersuchte ich Algenmaterial, das im Sommer 1951 in der Ramsau gesammelt und nach Wien gebracht worden war. Im folgenden Winter froren einige Proben davon leicht ein, tauten jedoch schon kurze Zeit darauf wieder auf. Das leicht eingefrorene Algenmaterial enthielt *Pleurotaenium minutum* (= *Penium minutum*) nahezu rein. An den Zellen dieser Art zeigten die Vakuolen eine eigenartige Ausbildung: In jeder Zelle waren drei große, runde oder ovale Vakuolen sichtbar. Eine davon lag stets in der Mitte der Zelle, die anderen zwei rechts und links in den Halbzellen. Jede dieser Vakuolen war stark mit kleinen braunen Körnchen (Kopetzky'sche Gallertkörperchen) erfüllt. Durch solche Körnchen erschienen die Vakuolen meist dunkelbraun und von einer kompakten Masse erfüllt. In zahlreichen

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Zellen waren die drei genannten Vakuolen zwar deutlich sichtbar, enthielten jedoch keine oder nur ganz spärlich Körnchen. Diese wenigen Körnchen bewegten sich in überaus lebhafter BMB, was auf die geringe Vikosität der Flüssigkeit innerhalb der Vakuolen hinweist. In 0,9 mol Traubenzucker gaben die Zellen eine vollkommen normale Konvexplasmolyse, bei vorsichtiger Deplasmolyse mit abgestuft sinkenden Traubenzuckerkonzentrationen nahm der verkleinerte Protoplast wieder seine ursprüngliche Lage ein; die drei Vakuolen waren auch nach Deplasmolyse wieder deutlich sichtbar.

Nach diesen Beobachtungen an frischen, unbeeinflußten Zellen von *Closterium lunula* und *Cl. libellula* sowie *Pleurotaenium truncatum, Pl. Ehrenbergii* und *Pl. minutum* schienen Zentrifugierungsversuche an diesen sowie an anderen Desmidiaceen-Arten von Interesse.

I. Zentrifugierungsversuche.

Closterium lunula zeigte nach einer Zentrifugierungszeit von 10 Minuten bei 2500 Touren allgemein eine starke Verlagerung des Chloroplasten. Die zentripetale Endvakuole mit ihren Gipskristallen war meist verschwunden. Dafür fanden sich überall im Zellraum eine größere Anzahl von Kristallen. Selbst der wandständige Plasmastrom führte mehrere Kristalle mit sich. Die zentrifugale Endvakuole war stets normal erhalten und enthielt eine große Anzahl von Kristallen. Das Vakuom an Stelle des verlagerten Chloroplasten ist durch feine, hyaline Plasmalamellen in zahlreiche größere und kleinere Wabenkammern unterteilt. Knapp unter dem wandständigen, in feinen Fäden strömenden Plasma liegen kleine, mehr oder minder rundliche periphere Wabenvakuolen, darunter wieder die großen zentralen Wabenvakuolen. Ein deutliches Wabenwerk ist jedoch nicht an allen Zellen einer zentrifugierten Probe zu sehen. Sehr häufig ist an Zellen mit stark verlagerten Chloroplasten an Stelle des Wabenwerks nur ein großer, einheitlicher Vakuolenraum festzustellen.

Gleiche oder ähnliche Verhältnisse nach Zentrifugierung konnten auch an *Closterium acerosum, Cl. striolatum* und *Cl. libellula* festgestellt werden. Bei *Closterium libellula* und *Cl. striolatum* verlagerten sich die Endvakuolen zusammen mit den Chloroplasten, wobei sie ihre runde Gestalt beibehielten. Bei *Closterium libellula* ist das aus polygonalen Vakuolen bestehende Wabenwerk ganz besonders deutlich sichtbar.

Bei Zentrifugierung (25 Minuten bei 2500 Touren) tritt auch

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

bei *Pleurotaenium truncatum* und *Pl. Ehrenbergii* eine starke Verlagerung des Chloroplasten ein. Sowohl bei Längs- als auch bei Seitenverlagerung des Chloroplasten wird das Wabenwerk sehr deutlich sichtbar (Abb. 1). Man kann wiederum eine Gliederung in große, rechteckige, zentrale und kleine, polygonale,

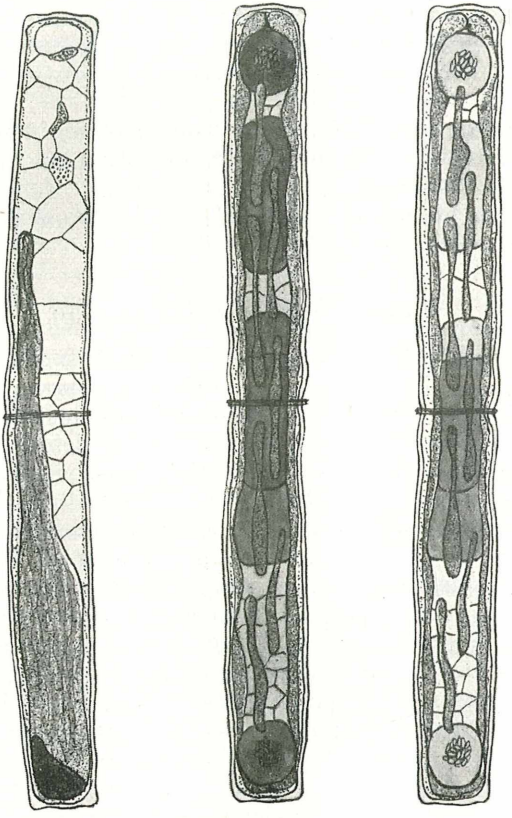

Abb. 1. Abb. 2. Abb. 3.

Abb. 1. *Pleurotaenium truncatum.* Der Chloroplast nach Zentrifuge stark längs verlagert. Im chloroplastenfreien Raum die Wabenvakuolen deutlich sichtbar.

Abb. 2. *Pleurotaenium truncatum.* Die mit Brillantkresylblau gefärbten Vakuolen beginnen sich zu entfärben.

Abb. 3. *Pleurotaenium truncatum.* Die Entfärbung ist weiter fortgeschritten; nur mehr die große Wabenvakuole in der Zellmitte schwach gefärbt.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

periphere Wabenvakuolen treffen. Bei der zentrifugalen Verlagerung des Chloroplasten reißen oft kleine Teile desselben ab und liegen dann als grüne, „zungenförmige" Stücke zwischen den Vakuolen eingebettet. In den kleinen peripheren Wabenvakuolen beobachtet man sehr häufig eine große Menge von kleinen bis kleinsten Körnchen in lebhafter BMB. Es handelt sich dabei um „junge" Gallertkörperchen, aus denen sich später die großen, dunkelbraunen, meist in den zentralen Vakuolen gelegenen Klumpen von Gallertkörperchen bilden. Die braunen Klumpen verlagern sich bei Längszentrifuge und liegen dann, zu einer braunen Masse zusammengepackt, am äußersten zentrifugalen Ende der Zelle (Kopetzky-Rechtperg 1931). Bei Seitenzentrifuge finden sie sich zu kleinen Portionen reihenweise an der zentrifugalen Längsseite. Die Endvakuolen sind nach Längszentrifuge meist nicht mehr festzustellen. Sie bleiben jedoch bei seitlicher Verlagerung des Chloroplasten normal erhalten. Bei einer in schräger Richtung zentrifugierten Zelle war auch die zentripetale Endvakuole verlagert. Diese war im untersten Drittel der Halbzelle als runde, von den übrigen Wabenvakuolen deutlich abgegrenzte und mit einer großen Anzahl von Kristallen erfüllte Vakuole sichtbar.

Micrasterias rotata (ebenso *M. Thomasiana* var. *notata, M. denticulata, M. americana, M. apiculata, M. truncata*) hatte nach 15 Minuten Zentrifuge bei 2500 Touren den Chloroplasten mäßig stark bis stark zentrifugal verlagert (vgl. Eibl 1941). Vom Chloroplasten ziehen feine, körnchenreiche. stark strömende Plasmafäden wandwärts. Das an Stelle des verlagerten Chloroplasten sichtbare Vakuom wird nur von strömenden Plasmafäden durchzogen, erscheint sonst aber vollkommen einheitlich. Nur bei *Micrasterias rotata, M. denticulata* und *M. Thomasiana* kann man manchmal in den Enden der Seitenlappen ein Netz aus feinen Plasmafäden beobachten. Anders verhält sich dagegen *Micrasterias truncata:* Hier zeigt sich bei Zellen mit schwach ausgebildetem Chloroplasten nach Seitenzentrifuge an Stelle des verlagerten Chloroplasten ein deutliches Wabenwerk (Abb. 4). Die plasmatischen Wandungen der großen polygonalen Wabenvakuolen sind hyalin, mikrosomenfrei und nicht strömend. Die Vakuolenwandungen unterscheiden sich demnach von den am Chloroplasten inserierten und wandwärts strömenden Plasmafäden (Eibl 1939) sehr deutlich und sind mit solchen kaum zu verwechseln. Das Wabenwerk kann bei *Micrasterias truncata* mehr oder weniger deutlich auch noch oberhalb des verlagerten Chloroplasten weiter verfolgt werden. So wie bei *Closterium lunula* kann man auch hier

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

nur bei einer geringen Anzahl von Zellen eines Präparates das Wabenwerk sehen. Der größere Teil der zentrifugierten Zellen zeigt ein einheitliches Vakuom.

Bei *Euastrum oblongum* und *Euastrum ansatum* zeigte sich nach Zentrifuge kein Wabenwerk. Bei *Euastrum Didelta* dagegen konnte ich einmal ein solches andeutungsweise feststellen (Abb. 5).

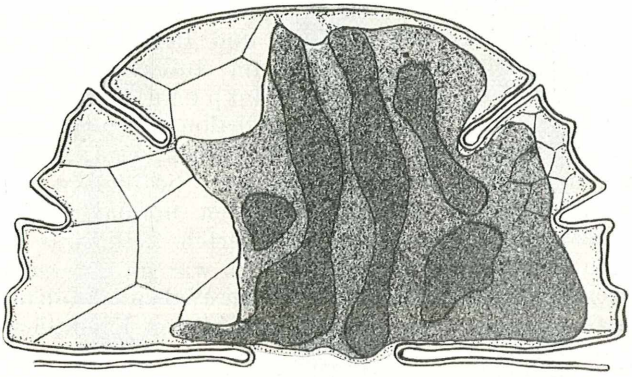

Abb. 4.

Abb. 4. *Micrasterias truncata.* Chloroplast durch Schleuderung seitlich verlagert; ein großmaschiges Wabenwerk wird sichtbar.

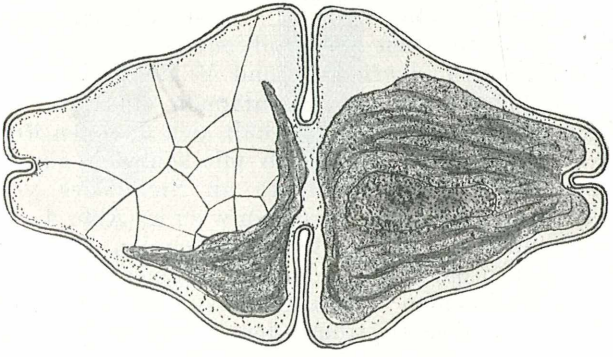

Abb. 5.

Abb. 5. *Euastrum Didelta.* Chloroplast nach Zentrifuge seitlich verlagert. In der einen Zellhälfte ein Wabenwerk andeutungsweise zu erkennen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Auch bei *Tetmemorus granulatus* erkennt man nach längerer Zentrifuge (30 Minuten bei 2500 Touren) ein deutliches und schön ausgebildetes Wabenwerk. Überaus elegant war eine wabige Kammerung bei *Spirotaenia condensata* nach längerem Zentrifugieren festzustellen. Hier ist das zentrale Vakuom, welches durch die Verlagerung des schraubenbandförmigen Chloroplasten deutlich sichtbar wird, in regelmäßig rechteckige Kammern gegliedert.

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, daß das Vorkommen von Wabenvakuolen bei den Desmidiaceen nicht nur auf die Gattung *Closterium* oder *Pleurotaenium* beschränkt ist, sondern daß auch bei *Micrasterias truncata, Euastrum Didelta, Tetmemorus granulatus* sowie *Spirotaenia condensata* ein solches ausgebildet ist. Wabenvakuolen können daher nicht als spezifisches Merkmal einer bestimmten Gattung angesehen werden.

Am schönsten war das Wabenwerk nach Zentrifugierung stets bei *Pleurotaenien* und *Spirotaenia* zu sehen. Bei *Closterien* (*Cl. lunula* im besonderen) kann man ein solches nach starker Zentrifuge (30 Minuten bei 2500 Touren) nicht mehr feststellen. Bei *Micrasterias truncata* zeigten nur Zellen mit schwach entwickelten Chloroplasten und mäßiger Verlagerung ein Wabenwerk. Endlich konnte ich bei *Euastrum Didelta,* welches einen starken Chloroplasten besitzt, nur ein einziges Mal, und da nur andeutungsweise, ein wabiges Vakuom feststellen. Es ist wahrscheinlich, daß bei Verlagerung eines massiven Chloroplasten (wie z. B. bei *Euastrum Didelta* oder bei *Micrasterias truncata*) die feinen Plasmalamellen der Wabenvakuolen zerreißen, ein Wabenwerk daher nicht mehr feststellbar ist. Die dünnen peripheren Chloroplastenbänder der Pleurotaenien dagegen können sich bei Zentrifuge aus den Wabenvakuolen, zwischen denen sie eingebettet liegen, zurückschieben, ohne dabei das Wabenwerk selbst zu zerstören[4]. Ähnlich wie bei den Pleurotaenien verhält sich auch der schraubenbandförmige Chloroplast von *Spirotaenia condensata.*

Nach dieser Überlegung scheint es möglich, daß auch andere Desmidiaceenarten, bei welchen bisher noch kein Wabenwerk festgestellt werden konnte, ein solches ausgebildet haben, daß jedoch die feinen Plasmalamellen desselben bei der zentrifugalen Verlagerung des massiven Chloroplasten zerrissen und so nicht mehr festgestellt werden können.

[4] Gicklhorn und Möschl (1929) fanden bei Zentrifugierungsversuchen an Chladophora, daß sich dort der (periphere) Chloroplast ohne das Wabenwerk zu zerstören verlagern kann.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

II. Vitalfärbeversuche.

Wie Cholnoky Höfler (1950) zeigten, stellen die Desmidiaceen ideale Versuchsobjekte für Vitalfärbestudien dar. Da, wie vorne beschrieben, bei einer Anzahl von Algen eine deutliche Ausbildung von „Wabenvakuolen" festgestellt werden konnte, schien es von besonderem Interesse, diese auf ihr Verhalten bei Vitalfärbung zu prüfen. Dabei sollen auch die Endvakuolen verschiedener Closterien- und Pleurotaenien-Arten hinsichtlich ihrer Farbstoffspeicherung vergleichend untersucht werden.

Closterien.

Im Februar 1952 stand sehr schönes Closterien-Material aus Karlstifter Hochmooren zur Verfügung. Es waren daher Vertreter dieser Gattung, mit denen ich die Vitalfärbestudien begann. Besonders reichlich war die große Art *Closterium lunula* vorhanden. Durch die Größe und die zarte unskulpturierte Zellwand erschien mir gerade diese Art für Färbeversuche besonders geeignet. Da es galt, das komplizierte Vakuolensystem zu studieren, kamen für die folgenden Versuche nur basische, leicht permeierfähige Farbstoffe, wegen der großen Empfindlichkeit (Loub 1951) vor allem Neutralrot, zur Verwendung. Die Farbstoffkonzentration war bei den verschiedenen Versuchen verschieden hoch und bewegte sich zwischen 1 : 2500 bis 1 : 10.000. Neutralrot wurde ungepuffert in Wiener Leitungswasser (p_H um 7,8) geboten.

Im Vitalfärbeversuch zeigte sich *Closterium lunula* als ein sehr dankbares Objekt. Mit Neutralrot ergab sich schon nach wenigen Minuten Färbedauer, nach einer anfänglich schwach roten Membranfärbung eine deutliche Metachromasie (vgl. Cholnoky-Höfler 1950) in der Färbung der Wabenvakuolen und der Endvakuolen. Während letztere sich stets rosa anfärbten, waren die Wabenvakuolen rötlichviolett gefärbt. Die Bildung von intensiv roten Entmischungskugeln konnte sowohl in den Endvakuolen wie auch in den Wabenvakuolen festgestellt werden. Die Größe der Entmischungskugeln stand meist in einem direkten Verhältnis zur Größe der Wabenvakuolen, in denen sie lagen. So fanden sich gegen die Enden der Zelle zu viele kleine, gegen die Mitte zu dagegen oft sehr große rote Kugeln. Die Endvakuolen enthielten meist eine, seltener zwei große rote Kugeln.

Bei Verwendung einer höheren Farbstoffkonzentration konnte man verhältnismäßig rasch den Beginn einer Vakuolenkontraktion feststellen. Diese begann stets an den Polen der Zelle (Abb. 6). Dort rundeten sich die

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

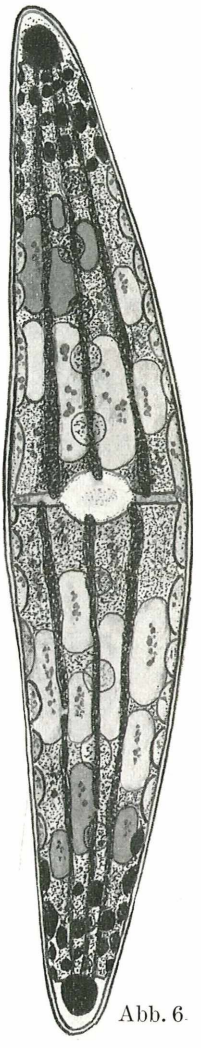
Abb. 6.

Abb. 6. *Closterium lunula.* Mit Neutralrot gefärbt. Endvakuolen gegenüber den anderen Wabenvakuolen stärker und metachromatisch verschieden gefärbt. An den Polen beginnende Vakuolenkontraktion.

kleinen rötlichviolett gefärbten Wabenvakuolen ab und wurden dünkler rosa. Sie verloren den violetten Farbton vollkommen. Die großen mittleren Wabenvakuolen kontrahierten sich erst viel später. Mit zunehmender Färbedauer wurden die Endvakuolen immer stärker rot und glichen in Farbton und Intensität der Färbung vollkommen den kontrahierten Wabenvakuolen. Die Endvakuolen zeigten niemals Vakuolenkontraktion. Auffällig war, daß letztere nach längerer Färbedauer ihre runde Gestalt verloren und eine mehr kegelförmige annahmen.

Nach sehr langer Färbedauer waren die meisten Zellen eines Präparates von intensiv dunkelroten, kontrahierten Wabenvakuolen erfüllt. Die Endvakuolen blieben dagegen auch bei stärkster Farbstoffspeicherung unkontrahiert und zeigten überraschenderweise eine wesentliche Vergrößerung ihres ursprünglichen Volumens. Um die zeitlichen Veränderungen während der Färbung zu zeigen, soll im folgenden eines der Versuchsprotokolle wiedergegeben werden:

Material: „Karlstift".

Farbstoff: Neutralrot 1 : 3000, gelöst in Wiener Leitungswasser. *Closterium lunula.*

19. Februar 1952:

13^h 17′ Farblösung dem Präparat zugesetzt.

13^h 19′ Schwach rote Membranfärbung. Die Wabenvakuolen sind rötlichviolett, die Endvakuolen rosa gefärbt. Innerhalb aller Vakuolen Bildung von intensiv roten Körnchen. In den Endvakuolen je eine große dunkelrote Kugel.

13^h 26′ Beginn einer Vakuolenkontraktion an den Polen der Zellen. Die Wabenvakuolen runden sich dort ab und werden dünkler rosa. Endvakuolen stärker rot gefärbt.

13^h 31′ Die Endvakuolen zeigen auffallende Gestaltsveränderungen. Sie nehmen eine kegelförmige Gestalt an.

13^h 40′ Die Vakuolenkontraktion hat sich nun auch auf die mittleren Abschnitte der Zelle erstreckt. Die kontrahierten Wabenvakuolen sind

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

hier jedoch bedeutend größer und weniger zahlreich als an den Polen. Diese mittleren Vakuolen zeigen gegenüber den polaren noch eine deutlich rötlichviolette Färbung.

13h 49′ Die Endvakuolen sind sehr formveränderlich. Sie strecken sich manchmal spitzkegelförmig in die Länge, gehen aber gleich wieder in eine breite, flachgedrückte Form über.

14h 08′ Die Vakuolenkontraktion hat sich weiterhin verstärkt. In den Zellpolen liegen zwischen den Chloroplastenleisten reihenweise kleine bis kleinste dunkelrote Vakuolen, die scheinbar durch Zerfall von vorher größeren Vakuolen entstanden sind. Die großen mittleren Vakuolen haben den violetten Farbton verloren und sind dünkler rot gefärbt. Die Endvakuolen zeigen die gleiche Färbung wie die mittleren kontrahierten Wabenvakuolen.

14h 18′ In vielen Fällen kann man eine deutliche Lageveränderung der Endvakuolen feststellen. Eine um 13h 26′ beobachtete Zelle hat die Wabenvakuolen vollkommen entfärbt. Nur die mittleren großen Vakuolen zeigen noch eine schwach rosa Färbung. Die Endvakuolen sind kegelförmig stark formveränderlich und schwach rosa gefärbt.

14h 35′ Neuerliche Zugabe einer Farblösung.

20. Februar 1952:

11h 15′ Alle Zellen der Probe lebend. (Normale Plasmaströmung.) Bei den meisten Zellen sehr starke Vakuolenkontraktion. Polare und mittlere Wabenvakuolen gleich intensiv rot gefärbt. Die Endvakuolen sind kegelförmig und stark vergrößert. In der Färbung gleichen sie vollkommen den kontrahierten Wabenvakuolen. In einigen Fällen nur geringe Kontraktion (Wabenvakuolen rosa), die Endvakuolen dagegen stark vergrößert und intensiv leuchtend kardinalrot.

11h 49′ Zugabe von Leitungswasser.

21. Februar 1952:

14h 05′ Die Hälfte der Zellen abgestorben. Die übrigen zeigen noch deutliche Plasmaströmung, machen jedoch einen allgemein nekrotischen Eindruck. Die Endvakuolen sind riesig vergrößert, kegelförmig und intensivst rot. Zwischen den Leisten des Chloroplasten liegen intensiv rot gefärbte kontrahierte Vakuolen. Die Chloroplastenleisten haben sich den Formen der Vakuolen weitgehendst angepaßt. Eine Anzahl von Zellen zeigt einen auffallend anderen Typus in der Anfärbung: Hier liegen zwischen den Chloroplastenleisten ziegelrot gefärbte, nur schwach kontrahierte Wabenvakuolen. Auch die Endvakuolen waren hier nur schwach ziegelrot gefärbt. Mit der Plasmaströmung werden kleine ziegelrote Vakuolen mitbewegt. Bei einer Zelle ist die Endvakuole in drei kleinere ziegelrote Teilvakuolen zerfallen. Nach zirka 4 Minuten fusionierten diese drei Teilvakuolen, und es entstand daraus wieder eine ziegelrote, runde, nach außen hin vollkommen normale Endvakuole.

Nach den Neutralrotfärbungen an *Closterium lunula* schien es von Interesse, vergleichende Färbeversuche auch mit anderen Closterienarten und mit anderen Farbstoffen durchzuführen. Im

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Herbst 1952 stand herrliches, frisches Algenmaterial aus Ramsauer und Tamsweger Hochmooren zur Verfügung.

Schon die ersten Färbeversuche zeigten auch bei anderen Closterienarten deutlich metachromatische Färbebilder. So färbten sich bei einer Farbstoffkonzentration von 1 10.000 nach kurzer Färbedauer die Endvakuolen von *Closterium libellula* deutlich violettrot an (vgl. Cholnoky-Höfler 1950), während das übrige Vakuom nur schwach hellrot, in vielen Fällen sogar vollkommen farblos blieb. Gleiche und ähnliche metachromatische Färbebilder lieferten auch *Cl. navicula* und *Cl. abruptum*. Bei anderen Arten, so bei *Cl. acerosum* und *Cl. parvulum* speichert die Endvakuole im zeitlichen Färbeverlauf den Farbstoff zwar schneller und intensiver als das Vakuom, eine deutliche Verschiedenfärbbarkeit bestand jedoch nicht. *Closterium striolatum* blieb bei Versuchen im Oktober 1952 stets ungefärbt (Höfler-Schindler 1953). Es war daher auffallend als Hirn (1953) feststellte, daß sich *Closterium striolatum* nur in den Wintermonaten färbt. Tatsächlich gelang es auch mir, Ende November 1952 nach längerer Färbedauer die Vakuolen von *Cl. striolatum* mit Neutralrot zu färben. Auch hier speicherten die Endvakuolen den Farbstoff zeitlich schneller und intensiver als das übrige Vakuom, Metachromasie war jedoch nicht zu beobachten. Auch *Closterium didymotocum* blieb in den Versuchen sehr häufig ungefärbt oder speicherte nur ganz schwach. *Closterium rostratum* färbte das Vakuom bis in den äußersten Endzipfel hinein einheitlich rot. Hier war eine deutliche Unterscheidung zwischen Endvakuole und übrigem Vakuom nicht möglich.

Die Bildung von Entmischungskugeln und Körnchen war allgemein zu beobachten. Die großen, intensiv rot gefärbten Kugeln entstanden stets durch Fusion vieler kleiner roter Krümel, die sich sehr rasch nach Färbebeginn bildeten. Bei *Closterium libellula* fand sich häufig eine stark gefärbte Endvakuole ohne Entmischungskugel, dagegen lagen in den ungefärbten Wabenvakuolen große, intensiv rote Kugeln. Bei einer *Closterium-navicula*-Zelle waren die Endvakuolen zu großen roten Entmischungskugeln geworden.

Noch deutlichere Färbebilder als bei den beschriebenen Neutralrotfärbungen erreichte man bei Verwendung von Brillantkresylblau in einer Verdünnung von 1 : 5000 oder 1 : 10.000. Da der Farbstoff erst im höheren alkalischen Bereich molekular vorliegt und durch das Plasma permeieren kann, wurde für die folgenden Untersuchungen eine auf p_H 9 bis p_H 10 gepufferte Farbstofflösung verwendet.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Closterium lunula, Cl. libellula und *Cl. navicula* zeigten auch hier eine eindeutig metachromatische Anfärbung der Endvakuolen gegenüber dem Vakuom. Und zwar speicherten bei den genannten Arten die Endvakuolen den Farbstoff stets mit rötlichviolettem Farbton, während sich die Wabenvakuolen hellblau anfärbten. Besonders stark war dieser Unterschied bei *Closterium libellula* zu beobachten. Hier waren die Endvakuolen stets dunkelrotviolett, das Vakuom hingegen nur ganz schwach hellblau oder auch vollkommen ungefärbt. In den hellblauen Wabenvakuolen lagen meistens zahlreiche blaue Körnchen oder Krümel. Bei *Closterium lunula* trat schon nach kurzer Färbedauer an den Polen der Zellen Vakuolenkontraktion ein. Die kleinen polaren Wabenvakuolen rundeten sich ab, verloren ihren blauen Farbton und nahmen einen rötlichvioletten, gleich dem der Endvakuolen an. Auch diese kontrahierten Wabenvakuolen standen in einem deutlichen Farbgegensatz zu den übrigen unkontrahierten Vakuolen. Ein kurzes Versuchsprotokoll soll die zeitliche Anfärbung veranschaulichen:

Material Tamsweg (7a′) und Karlstift.
Farbstoff Brillantkresylblau, p_H 10,8, Konzentration 1:10.000.

29. Oktober 1952:

11^h 53′ Färbung.

12^h 05′ *Closterium lunula:* Allgemein schwach blaue Membranfärbung. In einigen Fällen Endvakuolen schwach rötlichviolett gefärbt, das übrige Vakuom noch vollkommen farblos.

12^h 09′ *Closterium lunula:* Endvakuolen rötlichviolett gefärbt, das Vakuom deutlich hellblau. Beginnende Vakuolenkontraktion an den Polen der Zellen; und zwar liegen dort viele kleine, abgerundete Vakuolen zwischen den Chloroplastenleisten, die die gleiche rotviolette Färbung zeigen wie die Endvakuolen.
Closterium navicula: Die Endvakuolen sind rotviolett, das Vakuom dagegen hellblau.
Closterium parvulum: Endvakuolen leicht rötlichviolett, das Vakuom vollkommen farblos.
Closterium libellula: Die Endvakuolen sind auffallend stark rotviolett gefärbt. Die Wabenvakuolen sind hellblau und enthalten zahlreich intensiv blaue Farbkörnchen.

12^h 35′ *Closterium lunula:* Sehr deutlicher Unterschied in der Färbung der Endvakuole zum Vakuom. Die kleinen kontrahierten Wabenvakuolen in den Polen zeigen die gleiche Farbe wie die Endvakuolen.

Auch Toluidinblau, bei dem der Umschlagspunkt noch höher liegt (vgl. Höfler-Schindler 1951, Hirn 1953), eignete sich im hochalkalischen Bereich (p_H 12,5) gut zur Färbung der Closterien-Vakuolen. Bei *Cl. abruptum* und *Cl. navicula* färbten

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

sich häufig nur die Endvakuolen an, während das übrige Vakuom farblos blieb. Bei *Cl. abruptum* konnte man oberhalb der rotviolett gefärbten Endvakuole einen vollkommen ungefärbten Saftraum feststellen, der, vom strömenden Plasma modelliert, stark gestaltsveränderlich war. In dieser ungefärbten Vakuole bewegten sich wenige 2—3 μ große blaue Körnchen in starker BMB. Bei *Closterium striolatum* konnte man sehr häufig oberhalb der nur schwach rotviolett gefärbten Endvakuole eine oder zwei große, intensiv violette kontrahierte Vakuolen feststellen. Die Endvakuolen erschienen sehr klein, kugelrund und kompakt. Auch bei *Cl. acerosum* fanden sich oberhalb der Endvakuolen häufig eine oder mehrere kleine, gefärbte und abgerundete Vakuolen.

Pleurotaenien.

Für die folgenden Versuche stand sehr gutes Material aus Ramsauer Hochmooren (RMK)[5] zur Verfügung. Außerdem wurde auch noch Pleurotaenien-Material, das im Jahre 1951 in der Ramsau (RMK)[6] gesammelt und in Wien weiter kultiviert wurde, verwendet. In diesem Material hatten sich die Zellen stark vermehrt, zeigten jedoch gegenüber den Zellen des Frischmaterials deutliche Unterschiede. Vor allem fanden sich in jedem Präparat eine große Anzahl von abnormal geformten, als Forma clavata bekannten Zellen. Ein weiterer Unterschied war der, daß die Chloroplasten stets sehr massig und intensiv dunkelblaugrün waren. Im zentralen Vakuom, das hier so wie bei Zellen des frischen Materials in einzelne Abschnitte (Wabenvakuolen) gegliedert war, fanden sich eine große Anzahl von dunkelbraun gefärbten Körnchen (Kopetzky'sche Gallertkörperchen). In den kleinen peripheren Wabenvakuolen bewegten sich stets eine Menge von kleinen bis kleinsten Körnchen in lebhafter BMB. Vielfach waren solche Vakuolen von diesen Körnchen vollkommen erfüllt. In den Endvakuolen lagen stets große, ovale bis säulenförmige, scheinbar untereinander verklebte Kristalle, die sich von den Körnchen der Wabenvakuolen deutlich unterschieden. Durch diese großen und in ihrer Form anders gestalteten Körper sowie durch die meist pralle Rundung tritt die Endvakuole gegen die anderen Vakuolen stets deutlich unterschiedlich hervor.

Für die nachfolgenden Färbeversuche erwies sich vor allem *Pleurotaenium truncatum*, daneben auch noch *Pl. Ehrenbergii* und

Legit Prof. Dr. K. Höfler und Doz. Dr. H. Schindler.

Legit Prof. Dr. K. Höfler, Doz. Dr. H. Schindler und Dr. I. Krebs.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Pl. trabecula als ausgezeichnetes Versuchsobjekt. *Pleurotaenium truncatum* besitzt wie die meisten anderen Pleurotaenien nach Carter (1919 und 1920) einen parietalen, aus einzelnen Bändern bestehenden Chloroplasten, der je nach dem allgemeinen Zustand der Zellen entweder dick-massig, undurchsichtig und dunkelgrün oder aber auch nur aus dünnen, schmalen und lichtgrün durchsichtigen Bändern aufgebaut ist. Für meine Untersuchungen eigneten sich naturgemäß ganz besonders solche Zellen mit einem dünnen, arm entwickelten Chloroplasten. An solchen erkennt man sowohl zentrale als auch periphere Wabenvakuolen sehr deutlich.

Vitalfärbeversuche wurden mit Neutralrot, Neutralviolett, Brillantkresylblau und Toluidinblau in einer Verdünnung von 1 5000 bei entsprechender Pufferung durchgeführt.

Mit Neutralrot (1 5000, gelöst in Wiener Leitungswasser) zeigte sich schon nach kurzer Färbedauer, bei einer anfänglich schwach roten Membranfärbung, wodurch vor allem die Gallertporen sehr deutlich sichtbar wurden, eine diffuse, hellrote Vakuolenfärbung. Auffallend gegenüber der Färbung bei Closterien war jedoch, daß sich die Endvakuolen der Pleurotaenien weder durch ein schnelleres noch durch ein intensiveres Anfärben gegenüber den Wabenvakuolen unterschieden. Auch Metachromasie trat nicht auf. Bei *Pleurotaenium truncatum* färbten sich die großen zentralen Wabenvakuolen innerhalb der Chloroplastenbänder rosa an. Die Endvakuolen zeigten entweder gleiche oder etwas schwächere Anfärbung als die Wabenvakuolen. So war bei einer Zelle die Endvakuole der einen Zellhälfte stark rot gefärbt, die daranschließenden Wabenvakuolen dagegen nur schwach rosa. Die Endvakuole der anderen Zellhälfte war vollkommen farblos, die daranschließenden Wabenvakuolen dagegen dünkler rosa. In vielen Fällen waren in ein und derselben Zelle auch die Wabenvakuolen untereinander verschieden stark gefärbt. Die in den zentralen Wabenvakuolen sehr zahlreichen Kopetzkyschen Körperchen waren niemals gefärbt.

Nach längerer Färbedauer trat bei den meisten Zellen Vakuolenkontraktion ein. Auffallenderweise kontrahierten sich nur die peripheren Wabenvakuolen oberhalb der Chloroplastenbänder. Die zentralen Vakuolen färbten sich nur rosa an und blieben unkontrahiert. Die peripheren Wabenvakuolen rundeten sich mit zunehmender Kontraktion immer mehr ab, isolierten sich voneinander und wurden intensiv rot. (Abb. 7). Der Raum zwischen den kontrahierten Waben-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

vakuolen und dem wandständig strömenden Plasma erschien ebenso wie bei den Closterien optisch leer. Eine Aufquellung des Plasmas erfolgte nicht. Die Endvakuolen verhielten sich genau so wie die zentralen Wabenvakuolen, das heißt, sie waren nur rosa gefärbt und blieben stets unkontrahiert. Bei einigen extrem stark gefärbten Zellen konnte man auch eine leichte Kontraktion der zentralen Wa-

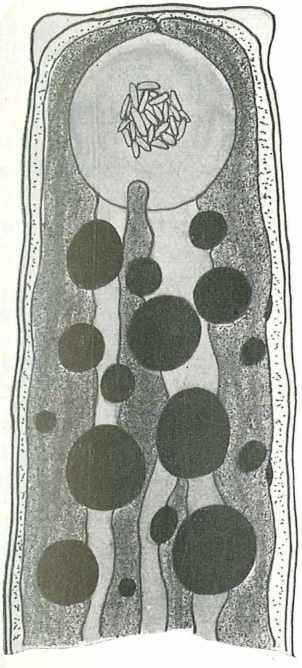

Abb. 7.

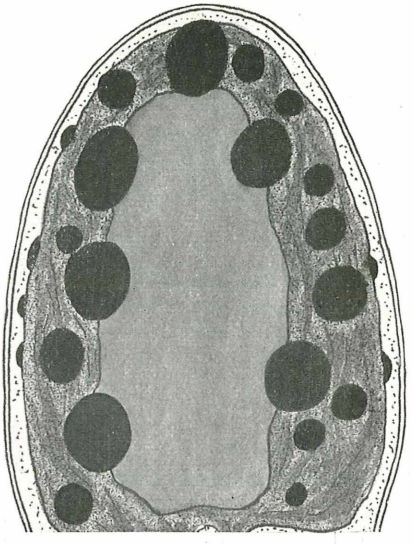

Abb. 8.

Abb. 7. *Pleurotaenium truncatum.* Mit Neutralrot gefärbt. Endvakuole und zentrale Wabenvakuolen hellrot und unkontrahiert. Oberhalb der Chloroplastenbänder starke Vakuolenkontraktion.

Abb. 8. *Pleurotaeniopsis turgidus.* Mit Neutralrot gefärbt. Zentrales Vakuom einheitlich rot gefärbt, oberhalb der Chloroplastenbänder viele intensiv gefärbte und kontrahierte Vakuolen.

benvakuolen feststellen. Ob es sich aber bei derartig intensiver Farbstoffspeicherung nicht schon um prä- oder postmortale Veränderungen handelte, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Auch bei *Pleurotaeniopsis turgidus* ergaben sich sehr deutliche Kontraktionsbilder: Oberhalb des Chloroplasten lagen eine größere Anzahl von intensiv roten und kontrahierten Vakuolen. Die große

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

zentrale Vakuole ist einheitlich, hellrot und unkontrahiert (Abb. 8). Die genannte Zelle konnte mehrere Tage hindurch beobachtet werden, ohne daß sich irgendwelche Veränderungen zeigten.

Auch Färbungen mit Neutralviolett (1 : 5000, gelöst in Wiener Leitungswasser) lieferten gleiche Ergebnisse wie Neutralrot, so daß auf eine genaue Schilderung derselben verzichtet werden kann.

Ein Versuchsprotokoll mit genauer Zeitangabe soll den zeitlichen Verlauf der Neutralrotfärbung zeigen.

Material: Ramsau RMK 14 P (1952).

Farbstoff Neutralrot, gelöst in Wiener Leitungswasser; Verdünnung 1 : 5000.

10. November 1952:

11^h 05′ Färbung.

11^h 21′ Leitungswasser durchgesaugt.

11^h 24′ *Pleurotaenium truncatum:* Endvakuolen und Wabenvakuolen allgemein rosa gefärbt. In einigen Fällen ist die Endvakuole stärker gefärbt als die Wabenvakuolen, in anderen wieder nahezu farblos. Eine Zelle: Die eine Endvakuole ungefärbt, das daranschließende Vakuom (Wabenvakuolen) rosa. Die andere Endvakuole stark rot, das daranschließende Vakuom hellrosa gefärbt.

12^h 05′ *Pleurotaenium truncatum:* Allgemein Vakuolenkontraktion. Bei den meisten Zellen sind die Endvakuolen rosa gefärbt. Sie haben die gleiche Färbung wie die unkontrahierten zentralen Wabenvakuolen. Die peripheren Wabenvakuolen sind vereinzelt abgerundet und kontrahiert. Sie sind 6—10 μ im Durchmesser und intensiv rot gefärbt.

11. November 1952:

10^h 43′ *Pleurotaenium truncatum:* Wabenvakuolen oberhalb der Chloroplastenbänder kontrahiert und stark dunkelrot gefärbt. Das zentrale Vakuom meist unkontrahiert und lichter rot gefärbt. Bei einer extrem stark gefärbten Zelle auch die Wabenvakuolen innerhalb der Chloroplastenbänder schwach kontrahiert. Die Endvakuolen allgemein hellrot. (Gleicher Farbton wie das unkontrahierte zentrale Vakuom.)

Pleurotaeniopsis turgidus: Zentrale Vakuole einheitlich rosa gefärbt. Oberhalb des Chloroplasten mehrere (12 μ) große dunkelrote Vakuolen.

12. November 1952:

10^h 00′ *Pleurotaenium truncatum:* Der Großteil der Zellen ist ungefärbt. Bei einigen noch eine schwach rosa Färbung der peripheren Wabenvakuolen zu erkennen.

Pleurotaeniopsis turgidus: Die Zelle hat ihre Färbung gegenüber der des Vortages nicht verändert.

Aufschlußreiche Färbebilder zeigten sich bei Versuchen mit Brillantkresylblau (1 5000, p_H um 9). Sowohl Endvakuolen wie auch die zentralen Wabenvakuolen von *Pleurotaenium truncatum* färbten sich mit gleichem, oft intensiv blauem Farbton an

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

und blieben unkontrahiert. Die peripheren Wabenvakuolen oberhalb des Chloroplasten dagegen zeigten schon nach kurzer Färbedauer Vakuolenkontraktion. Dabei rundeten sich einzelne Wabenvakuolen ab und wurden deutlich rotviolett. Diese Verschiedenfärbbarkeit zwischen den unkontrahierten hell- oder dunkelblauen zentralen Wabenvakuolen (und Endvakuolen) und den rotvioletten, kontrahierten peripheren Vakuolen war eindeutig festzustellen.

Überraschend war die Feststellung, daß sich die intensiv blau gefärbten zentralen Wabenvakuolen innerhalb weniger Minuten vollkommen entfärbten. Die peripheren Wabenvakuolen behielten ihre Färbung noch längere Zeit bei, wurden dann aber auch farblos. Die Versuche wurden mehrmals wiederholt und stets trat nach kurzer Zeit überall eine Entfärbung ein. Beim neuerlichen Durchsaugen einer Farblösung färbten sich die Vakuolen wieder an, um sich nach wenigen Minuten erneut zu entfärben.

Die zentralen Wabenvakuolen entfärbten sich nicht gleichzeitig auf einmal. Vielmehr behielten einzelne Vakuolen ihre Färbung noch längere Zeit bei, andere, unmittelbar an solche gefärbte Vakuolen angrenzende Waben waren dagegen schon vollkommen farblos. Die Entfärbung begann regelmäßig an den mittleren Wabenvakuolen jeder Halbzelle oder auch bei den Endvakuolen. Die Wabenvakuolen in der Zellmitte blieben stets am längsten gefärbt. Die Endvakuolen verhielten sich genau so wie zentrale Wabenvakuolen. Auch bei ihnen trat Färbung und Entfärbung in der besagten Weise ein.

Abb. 2 und 3 zeigen den typischen Verlauf der Entfärbung. In Abb. 2 sind die beiden Endvakuolen sowie zwei größere Vakuomabschnitte noch intensiv gefärbt. Das übrige Vakuom zeigt bereits nur mehr eine ganz schwache Anfärbung. In Abb. 3 sind auch die beiden Endvakuolen sowie die vorerst noch stark gefärbten Vakuomabschnitte nur mehr schwach blau, lediglich die mittleren Wabenvakuolen sind noch stärker gefärbt. Das übrige Vakuom ist vollkommen farblos.

Ein Versuchsprotokoll soll den zeitlichen Verlauf von Färbung und Entfärbung zeigen:

Material: RMK 14 P (1952).

Farbstoff: Brillantkresylblau, p_H 9,00 (gepuffert), Verdünnung 1 : 5000.

12. November 1952:

11^h 02′ Färbung.
11^h 21′ Pufferlösung durchgesaugt.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

11h 49′ *Pleurotaenium truncatum:* Die zentralen Wabenvakuolen und Endvakuolen sind dunkelblau gefärbt. Die peripheren Wabenvakuolen sind kontrahiert und rotviolett. Während der mikroskopischen Betrachtung tritt eine Entfärbung ein. Binnen 5 Minuten sind die zuerst stark gefärbten Wabenvakuolen farblos. Nur die Endvakuolen zeigen noch eine schwach blaue Anfärbung.

12h 18′ Dem Präparat wird neuerdings Farbe zugesetzt.

12h 23′ Die um 11h 49′ beobachtete *Pl.-truncatum*-Zelle, die sich vollkommen entfärbt hatte, zeigt wieder ein blau gefärbtes Vakuom. Die einzelnen großen Wabenvakuolen sind jedoch nicht einheitlich, sondern verschieden stark gefärbt. In jeder Zellhälfte erkennt man in der Mitte eine große, intensiv dunkelblau gefärbte Vakuole. Rechts und links derselben liegen je eine hellblau gefärbte Vakuole. Oberhalb der Chloroplastenbänder erkennt man die ungefärbten peripheren Wabenvakuolen. Die Endvakuolen sind nur schwach blau.

12h 28′ Die dunkelblaue Vakuole jeder Halbzelle entfärbt sich wieder und ist nur mehr hellblau.

12h 32′ Die Zelle ist wieder vollkommen entfärbt.

12h 34′ Dem Präparat wird neuerdings Farbe zugesetzt.

12h 35′ Eine andere Zelle: Die zentralen Wabenvakuolen färben sich wieder wie bei der vorher beobachteten Zelle an. Wieder ist in jeder Zellhälfte eine Vakuole stärker blau gefärbt. Die Endvakuolen sind hellblau, die peripheren Wabenvakuolen farblos.

12h 43′ Die Zelle hat sich weitgehend entfärbt. Nur mehr die zentralen Wabenvakuolen in der Zellmitte zeigen noch blaue Färbung. Endvakuolen farblos.

12h 55′ Zelle vollkommen entfärbt.

Auf die oben dargelegten interessanten Entfärbeerscheinungen wird im nachfolgenden Kapitel noch kurz zurückzukommen sein. Genauere Untersuchungen über Entfärbe- und Umfärbungserscheinungen gefärbter Desmidiaceen-Vakuolen sollen in einer weiteren Arbeit behandelt werden. Erst dort wird die Rolle von eventuellen Redoxvorgängen erörtert werden.

In einem anderen RMK-Material fand sich *Pleurotaenium minutum* (= *Penium minutum*) überaus reichlich. Wurde diese Art 5 Minuten mit Brillantkresylblau (1 : 5000, p_H 8,4) gefärbt, so zeigten sich eigenartige Verhältnisse: In jeder Zellhälfte liegt oberhalb des Chloroplasten außer den Endvakuolen noch eine große, ovale, mit einer Unzahl von Kopetzky'schen Körnchen erfüllte, violett gefärbte Vakuole. Der übrige Zellsaft erscheint hellblau.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Diese Zellen wurden mit 0,8 mol Traubenzucker behandelt und gaben eine vollkommen normale Konvexplasmolyse (Abb. 9). Bei vorsichtiger Deplasmolyse nahm der Protoplast wieder seine ursprüngliche Lage ein, ebenso wurden die zwei gefärbten Vakuolen wieder deutlich und unverändert sichtbar. Der Plasmolyseversuch beweist, daß es sich bei den zwei gefärbten Vakuolen nicht um zwei gefärbte Tonoplasten handelt, sondern daß vielmehr bei *Pleurotaenium minutum* an normal plasmolysierbaren Zellen isolierte, mit Körnchen erfüllte Vakuolen vorkommen können, welche sich bei Vitalfärbung intensiver und gegenüber dem übrigen Zellsaft metachromatisch anfärben.

Als ich im März 1953 mit dem Material RMK 12 G wieder Färbeversuche durchführte, fiel mir auf, daß sich die Vakuolen

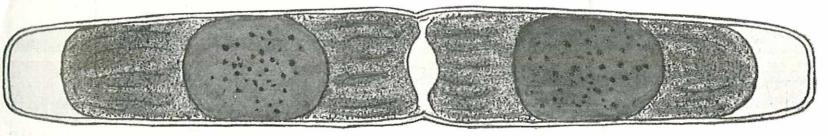

Abb. 9. *Pleurotaenium minutum.* Mit Brillantkresylblau gefärbt und mit 0,8 mol Traubenzucker plasmolysiert. Zwei isolierte, metachromatisch violett gefärbte Vakuolen sichtbar.

der meisten Zellen mit Brillantkresylblau nicht wie bei den früheren Versuchen blau, sondern oft intensiv violett anfärbten. Besonders deutliche Violettfärbung zeigte wieder *Pleurotaenium truncatum*, daneben aber auch *Micrasterias pinnatifida, M. denticulata* und ein kleines, nicht näher bestimmtes *Cosmarium*. Besonders auffallend verhielt sich *Desmidium Swartzii*: Der Großteil der Zellen hatte den Zellsaft violett gefärbt. Dagegen fanden sich immer wieder Zellen, die ein intensiv stahlblau gefärbtes Vakuom zeigten. Selbst Zellen ein und desselben Fadens waren untereinander nicht gleich gefärbt, sondern einige waren violett, andere dagegen blau. Es können sich demnach Zellen der gleichen Art, mit gleichem Farbstoff gefärbt und bei gleichen Versuchsbedingungen bald violett, bald blau anfärben. Diese Blaufärbung unterscheidet sich von der blaugrünen Färbung „voller" Zellsäfte, wie sie Höfler und Schindler (1951) bei einigen *Cosmarien* und *Euastren* feststellten, sehr deutlich.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Micrasterien, Euastren, Cosmarien und Xanthidien.

Bestes Versuchsmaterial stand aus Karlstift (*Micrasterias Thomasiana* var. *notata*), vor allem aber aus Tamsweg, zur Verfügung. Neutralrot (1 : 3000 oder 1 : 5000, gelöst in Wiener Leitungswasser), Brillantkresylblau (1 10.000, p_H 10,1) und Toluidinblau (1 : 10.000, p_H 12,5) dienten wieder als Färbemittel.

Zu Beginn der Färbeversuche waren die verschiedenen Typen der Farbstoffspeicherung innerhalb der Zelle auffällig (vgl. Choinoky-Höfler 1950). So sah man bei der gleichen Algenart nebeneinander in einem Präparat vier verschiedene Typen der Speicherung:

1. Die Zelle hat das Vakuom einheitlich gefärbt und keine Entmischungskugeln gebildet.
2. Das Vakuom der Zelle ist schwächer gefärbt und hat große, oft symmetrisch angeordnete Entmischungskugeln gebildet.
3. Das Vakuom ist schwach gefärbt, hat aber statt der großen Kugeln nur unregelmäßig verteilte Krümel gebildet.
4. Das Vakuom ist vollkommen ungefärbt, dafür liegen große intensiv gefärbte Kugeln oft regelmäßig angeordnet im Vakuom.

Die genannten vier Typen konnten besonders schön bei *Micrasterias rotata* beobachtet werden.

Bei den Micrasterias-Arten färbte sich das Vakuom zunächst einheitlich und ohne Differenzierung an. Bei *M. rotata, M. denticulata* und *M. Thomasiana* var. *notata* konnte man sehr häufig eine starke Anfärbung des Mittellappens feststellen. Diese quantitativen Unterschiede dürften aber nur durch die größere Dicke des Mittellappens gegenüber den Seitenlappen bedingt sein. Unterschiede bei den einzelnen Micrasterias-Arten konnten nur im zeitlichen Verlauf der Anfärbung des Vakuoms festgestellt werden. Überaus schnelle Vakuomfärbung zeigten *Micrasterias fimbriata* und *M. pinnatifida.* Mittelschnell färbten sich die großen Arten, wie *M. rotata, M. denticula* und *M. Thomasiana* var. *notata,* verhältnismäßig langsam *M. apiculata* und *M. americana.*

Im folgenden soll eines der Versuchsprotokolle wiedergegeben werden:

Material: Karlstift und Tamsweg.

Farbstoffe: Neutralrot 1 : 5000 in Wiener Leitungswasser gelöst; Brillantkresylblau 1 : 10.000, p_H 10,1.

27. November 1952:

12^h 04′ Färbung.
12^h 15′ Reines Leitungswasser bzw. Pufferlösung durchgesaugt.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Neutralrotfärbung:

12h 22′ *Micrasterias rotata:* Chloroplast schwach kontrahiert. Zellwand schwach rosa, Vakuom dunkelrosa gefärbt. An den Endlappen des Chloroplasten liegen viele rotbraune, kettenförmig zusammengeklebte Krümel. Ein Großteil der Zellen zeigt in den Enden keine Krümel, dafür liegen dort kleine oder größere rote Kugeln. Einige Zellen haben keinerlei Entmischungsprodukte gebildet, sondern zeigen eine Vakuolenfärbung.

12h 49′ *Micrasterias denticulata:* Das Vakuom ist intensiv dunkelrot gefärbt. In den Enden der Seitenlappen liegen viele kleine Kügelchen (Teilvakuolen). Das Vakuom ist in der Mitte der Zelle oberhalb des Chloroplasten abgerundet und kontrahiert.

28. November 1952:

10h 59′ *Micrasterias denticulata:* Alle Zellen der Probe lebend. Der Chloroplast meist stark kontrahiert. Das Vakuom stark rot gefärbt. Das Vakuom des Mittellappens ist meist etwas stärker gefärbt als das der Seitenlappen. In vielen Fällen ist das Vakuom in einzelne große, dunkelrote und abgerundete Teilvakuolen zerfallen.

11h 20′ *Micrasterias rotata:* Alle Zellen lebend. Beim Großteil der Zellen ist das Vakuom einheitlich rot gefärbt und unkontrahiert. Das Vakuom im Mittellappen ist meist etwas stärker gefärbt. In den Enden der Seitenlappen liegen häufig rotbraune, kettenförmig verklebte Krümel oder oft symmetrisch angeordnete rote Kugeln. In einigen Fällen ist das Vakuom zerklüftet und zeigt schwache Vakuolenkontraktion. Die Teilvakuolen sind alle intensiv rot gefärbt. Bei einer Zelle ist das Vakuom in einzelne große Teilvakuolen zerfallen, die im Gegensatz zu den kontrahierten Vakuolen anderer Zellen nur eine ganz schwache rosa Färbung zeigten.

Brillantkresylblaufärbung:

12h 31′ *Micrasterias rotata:* Chloroplast kontrahiert. Membran ungefärbt. Vakuom zeigt einheitliche hellviolettblaue Anfärbung. Das Mittellappenvakuom erscheint etwas dünkler. In den Seitenlappen liegen im Vakuom kleine dunkelblaue Körnchen.

12h 41′ *Micrasterias denticulata:* Vakuom intensiv violett gefärbt. Bei den meisten Zellen liegen in den Enden der Seitenlappen kleine hellviolette Teilvakuolen.

28. November 1952:

10h 58′ *Micrasterias denticulata:* Der Großteil der Zellen ist abgestorben. Bei den toten Zellen sind die Kerne orthochromatisch hellblau gefärbt. Bei einer lebenden Zelle ist das Vakuom stark kontrahiert und intensiv blauviolett gefärbt. In jedem Seitenlappen liegt eine meist violett gefärbte kleine runde Vakuole, in der sich eine violette Entmischungskugel in BMB bewegt. Manche dieser Vakuolen in den Endlappen sind vollkommen farblos (Abb. 10).

12h 33′ *Micrasterias rotata:* Alle Zellen abgestorben.
Micrasterias truncata: Ein Teil der Zellen noch lebend. An solchen ist das Vakuom intensiv violettblau gefärbt und zerfallen. In den äußersten Enden der Lappen liegen wieder farblose bis schwach violett gefärbte Teilvakuolen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Von besonderem Interesse waren *Micrasterias truncata, M. americana, Euastrum oblongum, E. Didelta, E. ansatum, E. affine, Cosmarium botrytis, C. tetraophthalmum*, kurz die Arten, die auf ihren zentral ausgespannten Chloroplasten noch mächtige Plastidenleisten entwickelt haben. Diese Leisten sind bei den genannten Arten zwar verschieden geformt, im wesentlichen aber

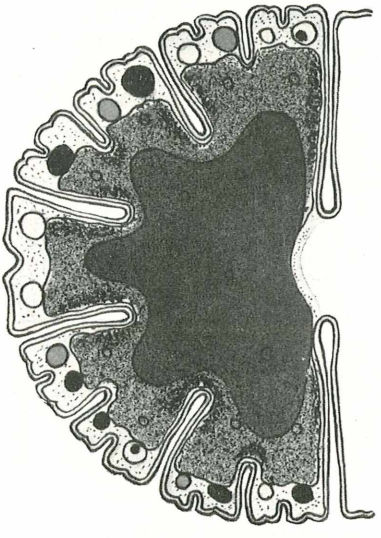

Abb. 10

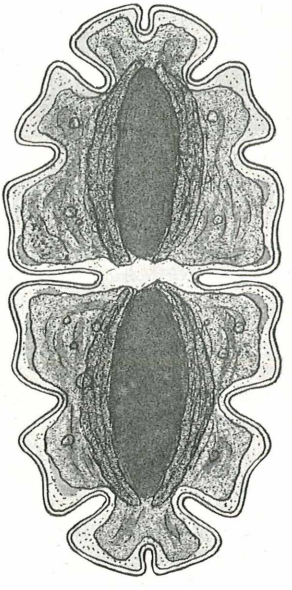

Abb. 11.

Abb. 10. *Micrasterias denticulata.* Vakuolenkontraktion nach Färbung mit Brillantkresylblau.

Abb. 11. *Euastrum oblongum.* Bei Färbung mit Neutralrot wird zuerst der mittlere Vakuomteil jeder Halbzelle deutlich angefärbt.

so angeordnet, daß sie schüsselförmige Hohlräume bilden. So sind z. B. bei *Micrasterias truncata* der meist dünnen zentralen Chloroplastenplatte beiderseits mächtige Plastidenleisten aufgesetzt, die in jeder Zellhälfte sechs, d. h. drei obere und drei untere, Hohlräume ausbilden. Diese Hohlräume sind prall mit Zellsaft erfüllt, wodurch wohl die Dehnung der Plastidenleisten zu einer mehr oder minder deutlichen „Schüsselform" zustande kommt. Bei *M. truncata* zeigt die zentrale Chloroplastenplatte in der Mitte jeder Zellhälfte sehr häufig vom Apex der Zelle her beginnende Reduktionserscheinungen (vgl. Carter 1919,

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Barg 1942). Die Reduktion der Plastidensubstanz beginnt am Apex der Zellen mit einer mehr oder minder großen Einbuchtung des Mittelabschnittes der zentralen Plastidenplatte. Da die zentrale Chloroplastenplatte aber den „Schüsselgrund" bildet, entsteht auf diese Weise ein Loch, durch das die obere „Schüssel" mit der unteren in Verbindung steht. Die Reduktion der Plastidensubstanz kann so weit führen, daß in jeder Zellhälfte scheinbar zwei Chloroplasten liegen, die nur mehr in Isthmusnähe zusammenhängen. Bei solchen Zellen bildet die mittlere obere und untere „Schüssel", hier von keiner zentralen Plastidenplatte getrennt, einen einzigen großen Hohlraum aus. Bei teilweiser Chloroplastenreduktion kann die ovale Einbuchtung leicht den Eindruck einer kleinen Vakuole (Tonoplasten) vortäuschen. Bei genauerer Beobachtung sowie schwacher Vitalfärbung ergibt sich jedoch eindeutig, daß das Trugbild lediglich durch die buchtenförmige Reduktion des „Schüsselgrundes" enstanden ist.

Bei Vitalfärbung mit Neutralrot tritt zuerst Färbung der schüsselförmigen Hohlräume ein (Abb. 11). Erst später färbt sich auch der übrige Teil des Vakuoms. Die schüsselförmigen Vakuomteile färben sich jedoch nie mit anderem Farbton als das übrige Vakuom, sondern nur stärker und schneller. Deutliche Abgrenzungen der „Schüsseln" voneinander konnten nie beobachtet werden. Bei *Micrasterias truncata* reicht jedoch der Chloroplast (bzw. dessen Leisten) bis ganz an das Wandplasma heran, und es scheint sehr wahrscheinlich, daß das Wandplasma mit den Chloroplastenleisten in Verbindung steht. Auf diese Weise gelangt man zu der Vorstellung, daß es sich auch hier um einzelne „Vakuolenkammern", vergleichbar den „Wabenvakuolen" der Closterien und Pleurotaenien, handelt, nur daß sie hier, den Formen und Größen der Chloroplastenleisten angepaßt, bedeutend größer, daher weniger zerteilt sind als z. B. bei den Closterien. *Micrasterias truncata* zeigte ja auch tatsächlich nach Zentrifuge ein deutliches, großmaschiges Wabenwerk.

Die Annahme, daß es sich hier um „Wabenvakuolen" im weiteren Sinne handelt, wird nun dadurch verstärkt, daß diese Vakuomabschnitte die Fähigkeit zur Vakuolenkontraktion im hohen Maße besitzen. Auf Abb. 12 ist zu entnehmen, daß die kontrahierten Vakuolen von *Micrasterias truncata* ein überaus symmetrisches Bild ergeben. In jeder durch die Chloroplastenleisten gebildeten „Schüssel" liegt eine, und zwar je nach der Form und Größe der „Schüssel" kontrahierte Vakuole. Niemals liegen innerhalb der „Schüssel" viele kleine kontrahierte Vakuolen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Vergleicht man nun die Verhältnisse mit denen bei Closterien (z. B. bei *Closterium lunula*), so findet man große Übereinstimmung. Bei *Cl. lunula* finden sich, wie bereits gezeigt wurde, auch in ungefärbten, unbeeinflußten Zellen zwischen den Chloroplastenleisten eine große Anzahl von Wabenvakuolen, die durch ihre pralle Zellsaftfüllung den Verlauf der Chloroplastenleisten vielfach be-

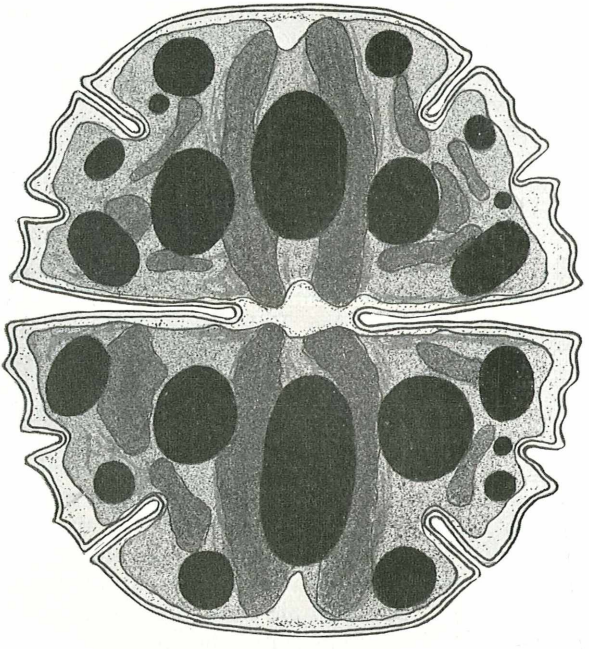

Abb. 12. *Micrasterias truncata.* Starke Vakuolenkontraktion nach Neutralrotfärbung. Die kontrahierten Vakuolen sind symmetrisch, den Zwischenräumen der Chloroplastenleisten entsprechend, angeordnet.

stimmen. Bei Vitalfärbung mit Neutralrot kontrahieren sich nun diese Vakuolen, so daß, den Räumen zwischen den Chloroplastenleisten entsprechend, in den Polen der Zelle kleine, gegen die Zellmitte zu große kontrahierte Vakuolen vorzufinden sind. Es ist daraus zu ersehen, daß der Farbstoff bei *Cl. lunula* lediglich eine Kontraktion der Wabenvakuolen, nicht aber eine Zerteilung des Vakuoms hervorrief. Eine Zerteilung des Vakuoms ist hier bereits durch die auch bei unbeeinflußten Zellen vorhandenen Wabenvakuolen schon gegeben. Damit soll die Möglich-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

keit nicht ausgeschlossen werden, daß bei extremer Färbung fallweise noch eine weitere, sekundäre Zerteilung der Vakuolen auf Grund der Kapillarspannung eintreten kann.

Beobachtet man nun die Verhältnisse bei *Micrasterias truncata* nach Vitalfärbung, so zeigt sich, daß die kontrahierten Vakuolen punkto Größe und Form in einem direkten Verhältnis zur Größe und Form der Zwischenräume innerhalb der Plastidenleisten stehen. (Das gleiche wurde auch für *Closterium lunula* gesagt.) Es ist deshalb auch hier ähnlich wie bei Closterien schon an unbehandelten Zellen eine Unterteilung des Vakuoms in Form von den Zwischenräumen der Chloroplastenleisten entsprechend großen Vakuolen anzunehmen. Der Farbstoff bewirkt wahrscheinlich auch hier nur eine Kontraktion dieser großen Vakuolenkammern.

Auch bei den großen Micrasterias-Arten, wie *M. rotata, M. Thomasiana, M. denticulata*, kommt es nach längerer Färbedauer und intensiver Farbstoffspeicherung zu einer Vakuolenkontraktion. Bei einer solchen liegen in den Seitenlappen zwischen den Chloroplastenwülsten abgerundete oder sackförmige, intensiv gefärbte, manchmal kompakt erscheinende Vakuolen. Im mittleren Teil einer jeden Halbzelle beobachtet man dagegen meist eine große, fünflappige Vakuole, die in die Seitenlappen hineinragt. Während bei *Micrasterias truncata* eine Unterteilung des Vakuoms in einzelne Wabenkammern wahrscheinlich schon vor der Färbung vorliegt, erfolgt hier eine Zerklüftung des Vakuoms erst bei starker Vakuolenkontraktion auf Grund eines lokal bestimmten kapillaren Zerfalls.

Die Färbeversuche an *Xanthidium armatum* (Abb. 13), *X. cristatum* und *X. antilopaeum* sowie an einigen Cosmarien zeigten nichts wesentlich Neues, sondern bestätigten nur die bei Closterien, Pleurotaenien und Micrasterien gefundenen Versuchsergebnisse.

Die Versuche mit Brillantkresylblau sowie Toluidinblau ergaben gegenüber den Neutralrotfärbungen nicht wesentlich andere Ergebnisse, so daß auf ihre Besprechung im einzelnen verzichtet werden kann. Auffallend war nur, daß *Micrasterias fimbriata* außer einer blauen Vakuolenfärbung auch im hoch alkalischen Bereich (p_H 12,5) stets die Zellwand blauviolett gefärbt hatte. *Cosmarium pseudopyramidatum* und *Euastrum obesum* zeigten im Vitalfärbeversuch mit Brillantkresylblau und Toluidinblau stets eine grünblaue Vakuolenfärbung, gegenüber der violetten Zellsaftfärbung der meisten anderen Desmidiaceen-Arten. Die beiden genannten Arten verhalten sich vital-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

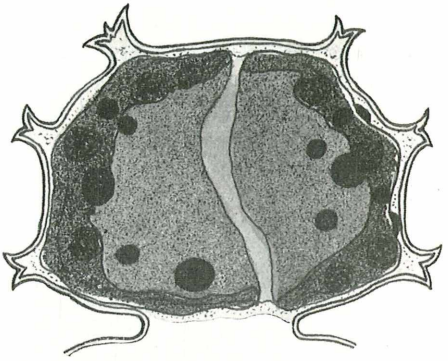

Abb. 13. *Xanthidium armatum.* Mit Neutralrot gefärbt. Inneres Vakuom einheitlich hellrot, oberhalb des Chloroplasten Vakuolenkontraktion.

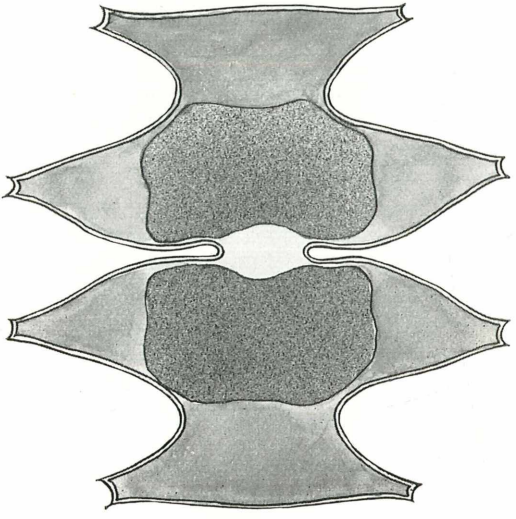

Abb. 14. *Micrasterias pinnatifida.* Starke Chloroplastenreduktion. Mit Brillantkresylblau Violettfärbung des einheitlichen Vakuoms.

färberisch demnach so wie *Netrium digitus* und scheinen so wie dieses einen vollen, d. h. speicherstofführenden Zellsaft zu besitzen (vgl. darüber die ausführlichen Arbeiten von Höfler und Schindler 1951 und Hirn 1953). Bei *Micrasterias pinnatifida* war der Chloroplast häufig stark reduziert, wodurch das unge-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

gliederte Vakuom sichtbar wurde (Abb. 14). Mit Brillantkresylblau färbte sich der Zellsaft dunkelviolett an. Vakuolenkontraktion konnte ich an Zellen mit extremer Chloroplastenreduktion nicht beobachten.

III. Vitalfärbeversuche an zentrifugierten Desmidiaceen-Zellen.

Da an zentrifugierten Desmidiaceen-Zellen die Vakuolen sehr deutlich zutage treten, schien es von Interesse, an solchen Vitalfärbestudien durchzuführen. Als Farbstoff diente Neutralrot 1 : 5000, gelöst in Wiener Leitungswasser.

Closterium lunula, Cl. Dianae und *Cl. libellula* zeigten schon nach wenigen Minuten Färbedauer und einer anfänglich schwach rosa Membranfärbung eine allgemein hellrote Färbung des Zellsaftes. Die Wabenvakuolen sind alle einheitlich rosa und treten im gefärbten Zustand weniger deutlich hervor. Die zentrifugale, noch erhaltene Endvakuole ist meist etwas stärker gefärbt. Nach 15 Minuten zeigen sich oberhalb des verlagerten Chloroplasten eine große Anzahl von mittelgroßen, runden, kontrahierten und intensiv rot gefärbten Vakuolen. Die Vakuolen im chloroplastenfreien Raum sind dagegen weiterhin schwächer rot gefärbt und zeigen keine Kontraktion (Abb. 17). Auch nach langer Färbedauer konnte ich in den meisten Fällen keine Vakuolenkontraktion im chloroplastenfreien Raum feststellen.

Auch bei *Pleurotaenium truncatum* trat nach längerer Färbedauer nur oberhalb des verlagerten Chloroplasten eine Vakuolenkontraktion ein. Die kontrahierten Vakuolen waren auch hier dunkelrot und abgerundet. Sowohl zentrale wie auch periphere Wabenvakuolen im chloroplastenfreien Raum sind einheitlich rot und zeigen keine Kontraktion. Bei einigen Zellen war ein Plastidenstück vom übrigen Chloroplasten bei der Verlagerung abgerissen und lag nun als kleine „grüne Zunge“ zwischen den Wabenvakuolen. Nur oberhalb dieser Chloroplastenzunge lagen einige rote Vakuolen, während die übrigen Vakuolen unkontrahiert und schwächer gefärbt blieben (Abb. 15).

Die Beobachtung, daß oberhalb des verlagerten Chloroplasten meist kontrahierte, stark gefärbte Vakuolen liegen, die Vakuolen im chloroplastenfreien Raum dagegen schwächer gefärbt und unkontrahiert blieben, konnte noch an anderen untersuchten Objekten festgestellt werden. So an *Xanthidium armatum, Pleurotaeniopsis turgidus, Tetmemorus granulatus* (Abb. 16), *Cosmarium*

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

tetraophthalmum (Abb. 18). *Micrasterias rotata, M. denticulata, M. apiculata* (Abb. 19) und *M. truncata.* Bei *M. rotata, M. denticulata* und *M. truncata* kann man nach sehr langer Färbedauer und intensivster Farbstoffspeicherung auch eine Kontraktion des einheitlichen Zellsaftraumes feststellen.

Eigenartige Vakuolenverhältnisse zeigte eine am 23. Jänner 1953 beobachtete *Micrasterias-rotata*-Zelle (Abb. 20): Diese durch ungleich große Halbzellen leicht zu erkennende Zelle hatte nach 25 Minuten Zentrifuge (bei 2500 Touren) den Chloroplasten

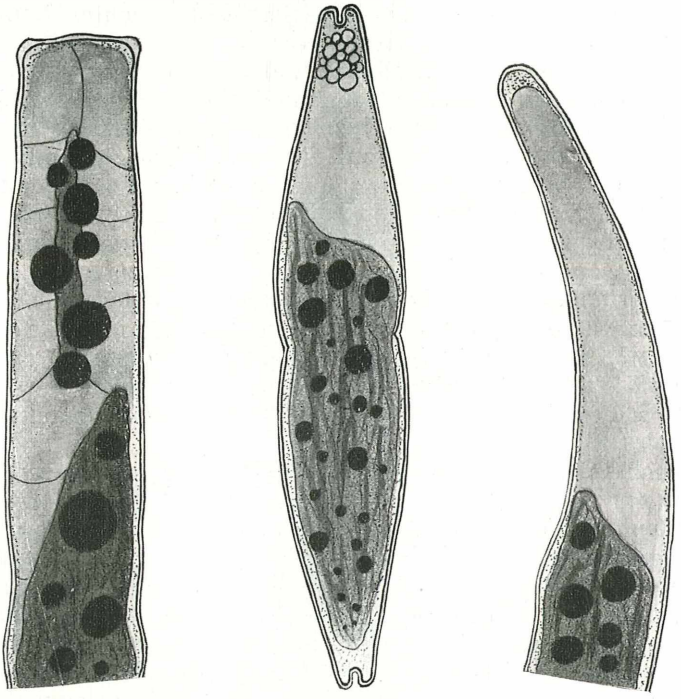

Abb. 15. Abb. 16. Abb. 17.

Abb. 15. *Pleurotaenium truncatum.* Nach Schleuderung ein Stück eines Chloroplastenbandes abgerissen. Bei Färbung mit Neutralrot oberhalb des Chloroplastenteilstückes starke Vakuolenkontraktion.

Abb. 16. *Tetmemorus granulatus.* Zentrifugiert und mit Neutralrot gefärbt. Nur oberhalb des verlagerten Chloroplasten Vakuolenkontraktion.

Abb. 17. *Closterium Dianae.* Vakuolenkontraktion nur oberhalb des verlagerten Chloroplasten.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

schräg seitlich verlagert. Dieser ballte sich in der größeren Zellhälfte durch das Zentrifugieren zu einer kompakten dunkelgrünen Masse zusammen, die, keilförmig eingeklemmt, nicht bis in die Seitenlappen hinein sich verlagern konnte. Dadurch blieb in jedem Seitenlappen ein chloroplastenfreier, von Zellsaft erfüllter Raum übrig. Diese Zelle wurde mit Neutralrot (1 : 5000, in Wiener Leitungswasser gelöst) gefärbt und nach 24 Stunden beobachtet: Die eine etwas größere Halbzelle zeigte in den Enden der zentrifugalen Seitenlappen, also dort, wo der Chloroplast sich nicht mehr hinein verlagern konnte, eine starke Vakuolenkontraktion.

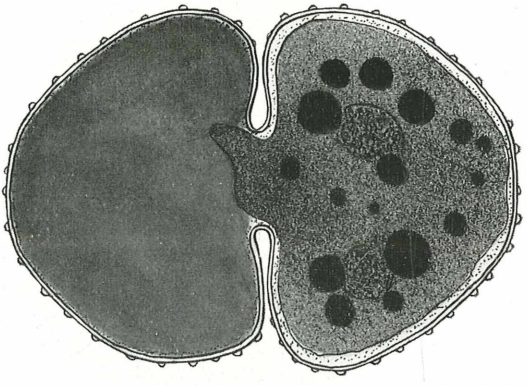

Abb. 18. *Cosmarium tetraophthalmum.* Nach Neutralrotfärbung nur oberhalb des verlagerten Chloroplasten Vakuolenkontraktion.

Oberhalb des verlagerten Chloroplasten waren keine gefärbten Vakuolen sichtbar. Lediglich im Hauptlappen ist oberhalb und über dem Chloroplasten hinaus eine stark kontrahierte und intensiv rot gefärbte Vakuole festzustellen. Das Vakuom im chloroplastenfreien Raum ist schwächer rot gefärbt und zeigt eine einheitlich schwache Kontraktion des gesamten Vakuoms. Der Raum zwischen dem nicht gequollenen Wandplasma und dem kontrahierten Vakuom ist hier hellrosa gefärbt. Die andere kleinere Halbzelle zeigt nur eine schwache Kontraktion des gesamten Vakuoms. Auch hier ist der Raum zwischen Wandplasma und kontrahiertem Vakuom hellrosa gefärbt.

Überaus interessante Färbebilder lieferten zentrifugierte Pleurotaenien-Zellen, die, mit Neutralrot gefärbt, bei Luftabschluß mehrere Tage hindurch beobachtet wurden.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Wie bereits berichtet, färben sich die Vakuolen im chloroplastenfreien Raum rot an und bleiben unkontrahiert, während oberhalb des verlagerten Chloroplasten viele rote und kontrahierte Vakuolen vorzufinden sind. Wird ein Präparat mit solch gefärbten Zellen mit Vaseline luftdicht abgeschlossen, so zeigen sich schon nach 24 Stunden typische und beim Großteil der

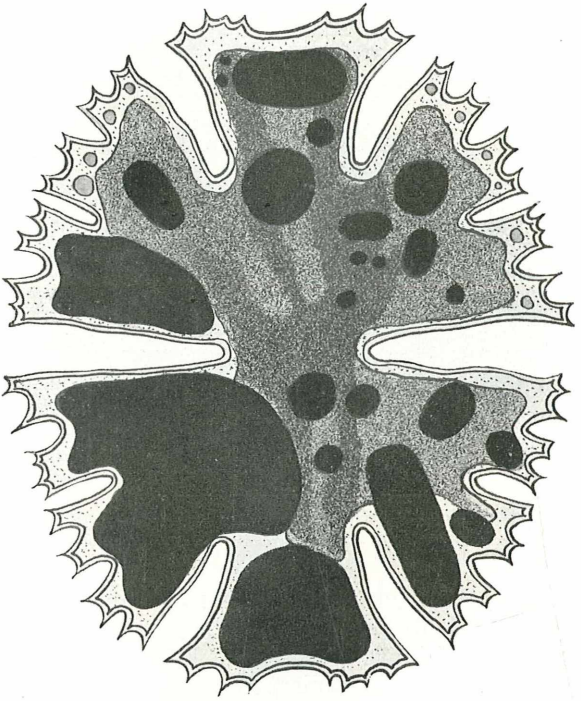

Abb. 19. *Micrasterias apiculata.* Zentrifugiert und mit Neutralrot gefärbt; nur oberhalb des verlagerten Chloroplasten Vakuolenkontraktion.

Zellen einheitlich ablaufende Entfärbungserscheinungen: Die zentripetalsten, d. h. die am weitesten vom verlagerten Chloroplasten entfernten Vakuolen werden farblos. Dann folgen in Richtung auf den Chloroplasten zu rosa oder lichtziegelrote und schließlich in unmittelbarer Chloroplastennähe stets intensiv rote unkontrahierte Wabenvakuolen (Abb. 21). Mit zunehmender Entfernung der Vakuolen vom Chloroplasten nimmt somit die

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Farbintensität immer mehr ab. Diese für die überwiegende Mehrzahl der untersuchten Zellen gültige Regel wird nur in wenigen Fällen durchbrochen. Und zwar läßt sich manchmal beobachten, daß die zentripetalsten Vakuolen noch eine deutliche Farbstoffspeicherung zeigen, während die mehr chloroplastenwärts gelegenen farblos sind (Abb. 22 und 23). Die Vakuolen in unmittel-

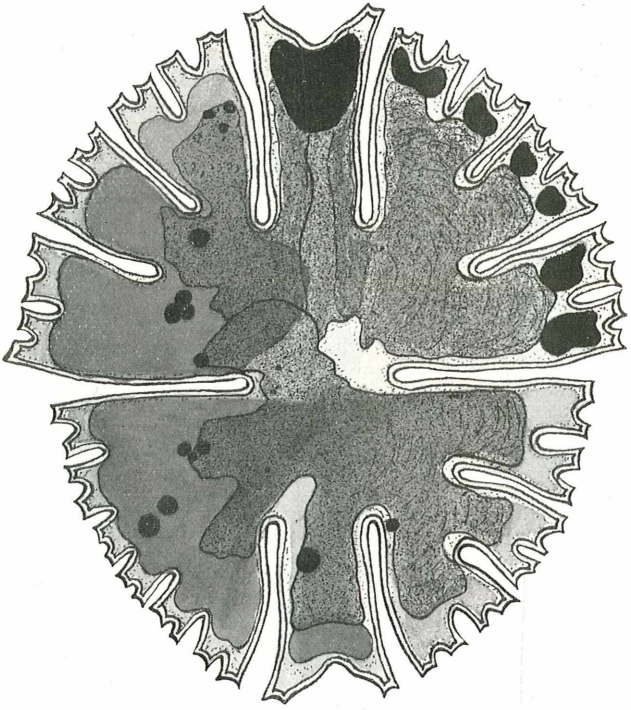

Abb. 20. *Micrasterias rotata.* Zentrifugiert und mit Neutralrot gefärbt; verschieden starke Vakuolenkontraktion.

barer Nähe des Chloroplasten sind dagegen stets intensiv gefärbt[7].

Ähnliche Entfärbeerscheinungen zeigten auch die Zellen einer kleinen *Mougeotia* sp.: Der Chloroplast hatte sich beim Zentrifugieren mäßig stark verlagert. Lediglich oberhalb bzw. in unmittelbarer Chloroplastennähe war das Vakuom stark rot gefärbt. Im chloroplastenfreien Raum war der Zellsaft vollkommen farblos. In einigen Fällen konnte man im farblosen Zellsaft ein bis zwei größere, dunkelrote Entmischungskugeln feststellen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Beobachtet man die Zellen mehrere Tage hindurch, so kann man feststellen, daß auch die vorerst noch rosa oder ziegelrot gefärbten Vakuolen ihre Farbe vollkommen verlieren. Lediglich in Chloroplastennähe bleibt die rote Färbung längere Zeit hindurch erhalten, aber auch diese kann verschwinden.

Abb. 21.

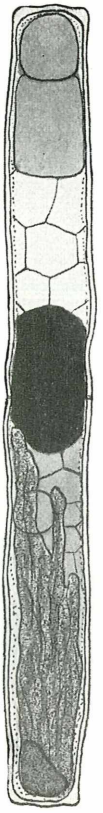

Abb. 22.

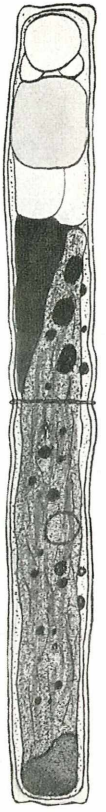

Abb. 23.

Abb. 21. *Pleurotaenium truncatum.* Zentrifugiert, mit Neutralrot gefärbt und luftdicht abgeschlossen. Beginnende Entfärbung der Wabenvakuolen: Die am weitesten vom Chloroplasten entfernten Vakuolen sind farblos, die daranschließenden hellrot; nur die Vakuolen in Chloroplastennähe intensiv rot gefärbt.

Abb. 22 und 23. *Pleurotaenium truncatum.* Zentrifugiert und mit Neutralrot gefärbt. Bei Luftabschluß Entfärbung der Wabenvakuolen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Nach diesen Versuchen zu schließen, scheint somit der Chloroplast wohl durch seine Assimilationstätigkeit und der damit verbundenen O_2-Abgabe eine hemmende Wirkung auf die Entfärbung der Vakuolen auszuüben. Auf genauere Untersuchungen in dieser Hinsicht sowie auf die Möglichkeit von Redoxvorgängen in den Desmidiaceen-Vakuolen soll erst in einer weiteren Arbeit eingegangen werden. Doch soll das Versuchsprotokoll über eine durch 21 Tage hindurch beobachtete *Pleurotaenium-truncatum*-Zelle im folgenden wiedergegeben werden:

Material: Ramsau RMK 12 G.
Zentrifuge: 2500 Touren; 30 Minuten.
Farbstoff: Neutralrot 1 : 5000, gelöst in Wiener Leitungswasser.

Pleurotaenium truncatum

15. April 1953:

17^h 15′ Färbung; die Präparate werden mit Vaseline luftdicht abgeschlossen und kühl, bei Lichtzutritt aufgestellt.

16. April 1953:

ca. 17^h Chloroplastenbänder stark zentrifugal verlagert. Die großen zentralen Wabenvakuolen sind deutlich sichtbar. Die zentripetalsten Wabenvakuolen sind farblos, die nachfolgenden rosa. Die Vakuolen in Chloroplastennähe stärker rot gefärbt. Oberhalb des verlagerten Chloroplasten einzelne rote kontrahierte Vakuolen. Das wandständige Plasma zeigt starke Strömung.

17. April 1953:

ca. 11^h Wandplasma stark strömend. Zentripetalste Wabenvakuolen farblos, die nachfolgenden rosa. Vakuolen beim verlagerten Chloroplasten intensiv rot!

18. April 1953:

9^h 37′ Starke Plasmaströmung. Die am 17. April noch rosa gefärbten Vakuolen sind vollkommen farblos.

20. April 1953:

16^h 30′ Rosa Plasmafärbung. Mit der Plasmaströmung bewegen sich zahlreiche intensiv rote und untereinander gleichgroße (2—3 μ) Kügelchen mit. Vakuolenfärbung unverändert.

21. April 1953:

10^h 45′ Die roten Kugeln im Plasmastrom sind überaus deutlich sichtbar. Die große Wabenvakuole, die am Vortag noch stärker gefärbt war, ist vollkommen farblos. Lediglich die Vakuolen oberhalb der Chloroplastenbänder sind noch stark rot gefärbt.

22. April 1953:

9^h 30′ Stark strömendes Plasma mit roten Kugeln. Keine Rückverlagerung des Chloroplasten. Oberhalb des verlagerten Chloroplasten mehrere kontrahierte Vakuolen sichtbar.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

23. April 1953:

9h 25′ Normale Plasmaströmung. Plasmafärbung schwächer rosa; die roten Kugeln fast verschwunden. Oberhalb des Chloroplasten stärker gefärbte Vakuolen. Wabenvakuolen im chloroplastenfreien Raum farblos.

27. April 1953:

8h 35′ Plasma stark strömend. Chloroplast nicht rückverlagert. Plasma ungefärbt. Die große Vakuole beim Isthmus, die bereits vollkommen entfärbt war, ist nun wieder schwach rosa gefärbt. Oberhalb des Chloroplasten rot gefärbte kontrahierte Vakuolen.

28. April 1953:

9h 25′ Plasmaströmung normal. Gegenüber dem Vortag keine Veränderung. Die zentrifugale Zellhälfte mit dem Chloroplasten ist von einem dichten Spirillensaum umgeben.

29. April 1953:

9h 34′ Keine Veränderungen.
13h 25′ Das Präparat wird mittels einer Reichert-Mikroskopierlampe, vor der ein Wasserfilter steht, stark beleuchtet.

30. April 1953:

9h 30′ Die durch 20 Stunden hindurch belichtete Zelle zeigt normale Plasmaströmung. Das gesamte Vakuom ist farblos. Die Vakuolen oberhalb des Chloroplasten sind noch ganz schwach rosa gefärbt. Das Präparat wird weiter belichtet.

16h 15′ Plasma strömt in dicken Strängen. In der Mitte der zentripetalen Zellhälfte ist eine große Plasmaamöbe in starker metabolischer Bewegung sichtbar. Alle Vakuolen der Zelle sind farblos. Die Spirillen bilden keinen Saum, sondern schwirren ungeregelt umher. Präparat wird weiter belichtet.

Mai 1953:

9h 45′ Plasma normal strömend. In die zentralen Wabenvakuolen reichen lange, sich schlängelnd bewegende Plasmatentakel hinein. Die Plasmaamöbe ist verschwunden. Die große Vakuole beim Isthmus ist durch feine Plasmalamellen in drei kleinere Vakuolen unterteilt. Alle Vakuolen, auch die oberhalb des Chloroplasten, sind farblos. Um die Zellhälfte, in der sich der verlagerte Chloroplast befindet, wieder ein dichter Spirillensaum. Das Präparat wird verdunkelt.

4. Mai 1953:

15h 38′ Plasma schwach und undeutlich strömend, sonst wie am 2. Mai.

Mai 1953:

ca. 17h Keine Plasmaströmung! Plasmolyse mit 1,0 mol Traubenzucker negativ. Zelle ist abgestorben.

Im Zusammenhang mit den oben beschriebenen Versuchen sei nochmals auf die starke individuelle Verschiedenheit der einzelnen

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Vakuolen hingewiesen, die sich uns hier wieder in schönster Weise offenbart. Neben den oft intensiv gefärbten Vakuolen in Chloroplastennähe liegen vollkommen farblose, neben diesen wieder solche mit Rosafärbung. Die überaus feinen Plasmalamellen, die die Wandungen der Wabenvakuolen bilden, besitzen die Fähigkeit, die einzelnen, eng benachbarten Vakuolen derart abzuschließen, daß von einer Vakuole mit starker Farbstoffspeicherung keine Farbdiffusion in die benachbarte farblose Vakuole stattfinden kann[8].

Die Plasmalamellen sind ferner so „abdichtend", daß chemische Veränderungen des Zellsaftes (Redox-Vorgänge) innerhalb einer Wabenvakuole nicht gleichzeitig auch eine wahrnehmbare Zellsaftveränderung der benachbarten Vakuole zur Folge haben muß. Auch darüber wird in einer weiteren Arbeit diskutiert werden.

Besprechung und Zusammenfassung.

In vorliegender Abhandlung wird über die Vakuolen von unbeeinflußten, zentrifugierten, vitalgefärbten sowie zentrifugierten und nachträglich gefärbten Desmidiaceen-Zellen berichtet.

An frischen Closterien- und Pleurotaenien-Zellen konnte ich neben den schon oft beschriebenen Endvakuolen eine Unterteilung des Vakuoms in zahlreiche „Wabenkammern" feststellen. Schon Andrew (1915) beschreibt schaumige Plasmastrukturen bei *Closterium moniliferum* nach Schleuderung. Czurda (1937) sagt über das Vakuom der Desmidiaceen, daß es manchmal in einzelne Kammern unterteilt sein kann. Höfler (1942, 1951) beschreibt bei *Pleurotaenium nodulosum* eine Unterteilung des Vakuoms in zahlreiche eckige „Wabenkammern". Es schien nun von Interesse, diese Wabenvakuolen neben den Endvakuolen der Closterien und Pleurotaenien einer genaueren Untersuchung zu unterwerfen.

Zentrifugierungsversuche an den verschiedensten Desmidiaceen-Arten ergaben, daß eine wabige Unterteilung des Vakuoms nicht nur bei Closterien und Pleurotaenien, sondern auch fallweise

[8] Es sei in diesem Zusammenhang auf die bei Vitalfärbeversuchen mit *Pleurotaenium truncatum* häufig zu sehende verschieden starke Anfärbung der beiden Halbzellen hingewiesen, die Anlaß dazu geben könnte, den Halbzellen ein verschieden physiologisches Verhalten zuzuschreiben. Wie entsprechende Versuche jedoch zeigten, ist die verschieden starke Anfärbung durch die Einströmrichtung der Farblösung bedingt. Umspült der Farbstoff lediglich eine Zellhälfte, so kommt es nur zu einer Färbung der Vakuolen dieser Halbzelle. Die Vakuolen der anderen Zellhälfte bleiben vermöge ihrer großen Selbständigkeit vollkommen farblos.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

bei *Micrasterias truncata, Euastrum Didelta, Tetmemorus granulatus* und *Spirotaenia condensata* durchgeführt ist. Bei Zellen ein und derselben Art kann nach Zentrifuge einmal eine Unterteilung festgestellt werden, ein andermal jedoch nicht. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß entweder bei Zellen mit einem dicken massiven Chloroplasten das Wabenwerk durch das Schleudern zerreißt und somit nur mehr ein einheitlicher Saftraum festgestellt werden kann oder daß nicht alle Individuen einer Art ein Wabenwerk ausgebildet haben.

Bei Pleurotaenien konnte ich eine Schichtung der Vakuolen in große, meist rechteckige zentrale Wabenvakuolen innerhalb der Chloroplastenbänder und in kleine, polygonale periphere Wabenvakuolen oberhalb, knapp unterhalb oder zwischen den Plastiden beobachten. Bei Desmidiaceen mit zentral rippenwalzenförmigem Chloroplasten (Closterien) liegen die Wabenvakuolen zwischen den Chloroplastenleisten und spannen diese zu ihrer charakteristischen Gestalt.

Die plasmatischen Wandungen der Wabenvakuolen unterscheiden sich vom wandständig strömenden, stark granulierten Plasma sehr wesentlich: Es sind feine, hyaline, meist mikrosomenfreie Lamellen ohne sichtbarer Plasmaströmung. Auf Grund dieser Feststellung scheint ein Vergleich der Wabenvakuolen der Desmidiaceen mit dem „Plasmamosaik" von *Haemaria discolor* (Molisch 1917) und dem „Plasmaschaum" von *Cladophora* (Gicklhorn und Möschl 1929) berechtigt.

Sowohl bei *Haemaria* als auch bei *Cladophora* ist der Zellsaftraum durch feine hyaline Plasmalamellen in polygonale Kammern gegliedert. Die *Haemaria*-Raphidenzellen haben ein peripheres Wabenwerk sowie ein zentrales Vakuom, in welchem das Raphidenbündel liegt, ausgebildet. Molisch spricht die Vermutung aus, daß die Ausbildung eines Plasmamosaiks irgendwie mit der Schleimproduktion in Verbindung steht. So zeigen gerade die Salep-Schleim produzierenden Orchideenzellen häufig eine Gliederung ihres Zellsaftraumes in einzelne Kammern (vgl. Schulze 1907 bei anuren Amphibien). Da nun alle Desmidiaceen-Arten, bei denen ein Wabenwerk ausgebildet war, auch eine reiche Produktion an Bewegungsgallerte haben (vgl. Nägeli 1849, Krieger 1937), ließe sich vielleicht mit aller Zurückhaltung auch hier die Ausbildung von Wabenvakuolen mit der Schleimbildung in Beziehung bringen. Bekanntlich schreibt Kopetzky-Rechtperg (1931) den Vakuolen der Desmidiaceen einen großen Gehalt an Pektinstoffen zu.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Im Vitalfärbeversuch mit Neutralrot, Brillantkresylblau und Toluidinblau ergibt sich bei mehreren Closterium-Arten ein deutlicher Unterschied zwischen den Endvakuolen und den Wabenvakuolen. Cholnoky und Höfler (1950) stellten fest, daß sich die ersteren stets schneller und intensiver, bei *Closterium libellula* auch metachromatisch verschieden anfärben. Ich konnte diese Beobachtung bestätigen, und außerdem bei *Closterium lunula, Cl. abruptum* und *Cl. navicula* eine deutlich metachromatische Anfärbung der Endvakuolen feststellen. Überraschend war die Feststellung, daß sich die Endvakuolen der Pleurotaenien weder durch ein schnelleres noch durch ein intensiveres Anfärben den Wabenvakuolen gegenüber unterschieden. Sie verhalten sich vitalfärberisch genau so wie die zentralen Wabenvakuolen.

Die Vakuolen der Pleurotaenien fallen im Färbeversuch durch ihre große Selbständigkeit auf. Vielfach kann man innerhalb einer Zelle neben stark gefärbten Wabenvakuolen solche mit ganz geringer oder gar keiner Farbstoffspeicherung finden. Ähnliche Verhältnisse beschreiben auch Gicklhorn und Möschl (1929) bei Neutralrotfärbung von Cladophora und Diskus und Kiermayer (1953) bei Färbeversuchen mit Brillantkresylblau an *Haemaria discolor*. Für die große Selbständigkeit der Wabenvakuolen sprechen auch Beobachtungen an *Pleurotaenium minutum:* Hier lag in jeder Halbzelle in der Zellmitte oberhalb des Chloroplasten je eine isolierte, ovale, mit braunen Gallertkörperchen erfüllte Vakuole. Plasmolyseversuche ergaben, daß diese Vakuolen keineswegs Tonoplastenstadien darstellen, sondern daß solche Zellen vollkommen normal plasmolysieren. Bei Vitalfärbeversuchen mit Brillantkresylblau zeigte sich in jeder Zellhälfte eine tingierte Vakuole, welche metachromatisch violetten Farbton aufwies. Auch solche Zellen gaben normale Plasmolyse. Es scheint somit möglich, daß bei völlig normal plasmolisierbaren *Pleurotaenium-minutum*-Zellen gelegentlich selbständige, isolierte, mit Gallertkörperchen erfüllte Vakuolen vorkommen können. Dies rechtfertigt die Feststellung Czurdas, „daß einzelne Vakuolenteile bisweilen selbständig“ sein können.

Vakuolenkontraktion sah ich bei geeigneten Versuchsbedingungen bei allen untersuchten Algenzellen eintreten (vgl. Cholnoky Höfler 1950), mit Ausnahme von *Netrium digitus*. Lediglich bei Färbeversuchen an zentrifugierten Zellen verschiedener Desmidiaceen-Arten kommt es in dem durch das Zentrifugieren chloroplastenfrei gewordenen Raum fast nie zu einer Vakuolenkontraktion. Auch die großen zentralen Vakuolen von

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Pleurotaenium truncatum oder das einheitliche Vakuom von *Pleurotaeniopsis turgidus* zeigte keine Vakuolenkontraktion. Abgerundete kontrahierte und intensiv gefärbte Vakuolen konnten nur oberhalb des Chloroplasten festgestellt werden. Bei Closterien liegen sie zwischen den Leisten des rippenwalzenförmigen Chloroplasten.

Besonders deutlich war eine Vakuolenkontraktion bei *Closterium lunula* und *Pleurotaenium truncatum,* wo eine Kontraktion der Wabenvakuolen vor sich ging, zu beobachten. Hierbei isolieren sich die einzelnen Vakuolen, werden rund und intensiv gefärbt. Der Raum zwischen ihnen erscheint optisch leer, das Wandplasma zeigt keine deutlich sichtbare Aufquellung und strömt völlig normal.

Schon Cholnoky-Höfler wiesen darauf hin, daß die Vakuolenkontraktion bei den Desmidiaceen ein „zytologisches Phänomen" darstellt, das „in gewisser Hinsicht grundsätzlich neu erscheint". Dies vor allem deshalb, weil bei den Desmidiaceen „der Raum zwischen Tonoplast und Zellwand wohl sicher nicht . . vom gequollenen Zytoplasma erfüllt ist", während Küster (1926), Weber (1930) und Henner (1934) bei Gewebszellen mit der Vakuolenkontraktion verbunden eine Aufquellung des Zytoplasmas feststellten. Auch bei dem Aggregationsvorgang in den Zellen der schleimsezernierenden Tentakel von Drosera (Åkerman 1917), bei dem mit der Vakuolenkontraktion auch eine Zerschnürung der Vakuolen einhergeht, ist der Raum zwischen den kontrahierten Vakuolen und der Zellwand vom gequollenen Plasma erfüllt. Cholnoky-Höfler gelangen für den Vorgang der Vakuolenkontraktion zu der Ansicht, daß „die Vakuolenwände bei den Algen sich vom Plasmawandbelag lösen und daß farblose Flüssigkeit den Raum zwischen Tonoplasten und Wandplasma einnimmt".

Bei den Algen mit einem in Waben gekammerten Saftraum lösen sich bei Vakuolenkontraktion die einzelnen Wabenkammern voneinander. Sie runden sich ab, der Raum zwischen ihnen erscheint von einer farblosen Flüssigkeit erfüllt. Die hyalinen, mikrosomenfreien und nicht strömenden Lamellen, die die Wabenvakuolen voneinander trennen, bestehen demnach möglicherweise aus zwei leicht beweglichen kohäsiven Plasmalagen, die voneinander durch ein „Plasmasegel" getrennt sind. Ein solches „Segel" könnte für die große Fähigkeit der Wabenvakuolen, sich voneinander zu isolieren, verantwortlich gemacht werden. Außerdem würde ein „Plasmasegel" mit beiderseitiger Auflage von lipoider Flüssigkeit bedeutend

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

schwerer durchlässig sein, als eine homogene, leicht flüssige Tonoplastenlamelle. Letzteres wird dadurch bekräftigt, daß Höfler (1952) für isolierte Tonoplasten Farbionenpermeabilität nachweisen konnte.

Bei Vitalfärbung von *Pleurotaenium truncatum* mit Brillantkresylblau zeigten sich spontane Entfärbeerscheinungen. Von den einheitlich blau gefärbten zentralen Wabenvakuolen begannen sich einige lokal bestimmte Vakuolen zu entfärben, während andere ihre Färbung erst viel später verloren. Am längsten behielt stets die Vakuole in der Zellmitte ihre Färbung bei. Beim neuerlichen Durchsaugen einer Farblösung färbten sich die Vakuolen wieder an, um jedoch nach kurzer Zeit in der gleichen, lokalbestimmten Reihenfolge farblos zu werden. Der Farbstoff konnte nach der Entfärbung weder im Plasma noch in der Zellwand festgestellt werden. Die Zellen erschienen vollkommen farblos.

Interessante Entfärbeerscheinungen ergaben sich ferner bei *Pleurotaenium*-Zellen, die durch Zentrifugierung den Chloroplasten verlagert hatten und nachträglich mit Neutralrot gefärbt wurden. Bei vollkommenem Luftabschluß zeigte sich bereits nach 24 Stunden eine typische Vakuolenentfärbung. Diese war um so stärker, je weiter die Vakuolen vom verlagerten Chloroplasten entfernt waren. Stark gefärbt blieben stets nur die Vakuolen in unmittelbarer Chloroplastennähe. Bei Zellen mit seitlich verlagerten Chloroplasten trat in den meisten Fällen keine Entfärbung ein.

Auf genauere Untersuchungen über ähnliche Entfärbeerscheinungen sowie auf die Möglichkeit von Redox-Vorgängen in den Vakuolen der Desmidiaceen wird in einer weiteren Arbeit eingegangen werden.

Literaturverzeichnis.

Åkerman, A., 1917: Untersuchungen über die Aggregation in den Tentakelzellen von *Drosera rotundifolia*. Bot. Notiser 145.

Andrews, F. W., 1915: Die Wirkung der Zentrifugalkraft auf Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot. 56, S. 221, 251.

Barg, T., 1942: Beiträge zur Cytomorphologie der Desmidiaceen. Archiv f. Protistenkunde, Bd. 95, Heft 3/391.

Bary, de, 1858: Untersuchungen über die Familie der Conjugaten. Leipzig.

Carter, N., 1919: Studies on the Chloroplasts of Desmids I—II. Annals of Bot. XXXIII, 215 u. 467.

— 1920: Studies on the Chloroplasts of Desmids III—IV. Annals of Bot. XXXIV, 265, 303.

Cholnoky, B. von und Höfler, K., 1950: Vergleichende Vitalfärbeversuche an Hochmooralgen. Sitz.-Ber. d. Öst. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 159. Bd., Heft 6—10, 143.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Cholnoky, B. von und Schindler, H., 1951: Winterliche Diatomeen-Aspekt des Ramsauer Torfmoores. Verh. d. zool.-bot. Ges., Bd. 92, S. 228.
Czurda, V., 1937: Conjugatae. In: Linsbauers Handbuch der Pflanzenanatomie. II. Abt., 6, Berlin.
Diskus, A. und Kiermayer, O., 1953: Die Raphidenzellen von *Haemaria discolor* bei Vitalfärbung. Protopl. (im Druck).
Drawert, H., 1938: Beiträge zur Entstehung der Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung mit Neutralrot. Ber. d. d. Bot. Ges. 56, 123.
— 1940: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 34, 159.
— 1948: Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. Zeitschr. f. Naturforschung, Bd. 3 b, 111.
— 1949: Zur Frage der Methylenblauspeicherung in Pflanzenzellen II. Zeitschr. f. Naturforschung, Bd. 4 b, 35.
Eibl, K., 1939 a: Kontraktion der Chromatophoren bei *Micrasterias rotata*. Protopl. 32, 251.
— 1939 b: Das Verhalten der *Spirogyra*-Chloroplasten bei Zentrifugierung. Protopl. 33, 73.
— 1939 c: Studien über das Plasmolyseverhalten der Desmidiaceen-Chromatophoren. Protopl. 33, 531.
— 1941: Die Restitution der Chromatophorenform bei *Micrasterias rotata* nach Schleuderung. Protopl. 35, 595.
Fischer, A., 1884: Über das Vorkommen von Gipskristallen bei den Desmidiaceen. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 14.
Gicklhorn, J. und Möschl, L., 1929: Vitalfärbung und Vakuolenkontraktion an Zellen mit stabilem Plasmaschaum. Protopl. 9, 531.
Hauptfleisch, P., 1888: Zellmembran und Hüllgallerte der „Desmidiaceen". Diss. Greifswald.
Henner, J., 1943: Untersuchungen über Spontankontraktion der Vakuolen. Protopl. 21, 81.
Hirn, I., 1953: Vitalfärbestudien an Desmidiaceen. Flora, Bd. 140, 453.
Höfler, K., 1926: Über Eisengehalt und lokale Eisenspeicherung in der Zellwand der Desmidiaceen. Sitzungsber. d. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 135, 103.
— 1942: Einige Beobachtungen an *Closterium Dianae* und *Pleurotaenium nodulosum*. Protopl. 37, 283.
— 1951: Plasmolyse mit Natriumkarbonat. Zur Frage des Plasmalemmas bei Süßwasseralgen und bei Gewebszellen von Landblütenpflanzen. Protopl. 40, 426.
— 1952: Über die Farbionenpermeabilität der Tonoplastenmembran. Ber. d. d. Bot. Ges., Bd. 65, Heft 6/183.
Höfler, K. und Schindler, H., 1951: Vitalfärbung von Algenzellen mit Toluidinblaulösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentration. Protopl. 40, 137.
— 1952: Algengallerten im Vitalfärbeversuch. Österr. Bot. Zeitschr. 99, 529.
— 1953: Vitalfärbbarkeit verschiedener Closterien. Protopl. 42, 296.
Kinzel, H., 1953: Untersuchungen über die Chemie und Physikochemie der Gallertbildungen von Süßwasseralgen. Österr. Bot. Zeitschr., Bd. 100, 25.
Klebs, G., 1885: Bewegung und Schleimbildung der Desmidiaceen. Biolog. Zentralblatt, Bd. 5, 353.
— 1886: Über die Organisation der Gallerte bei einigen Algen und Flagellaten. Unters. Bot. Inst. Tübingen 2/333.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Kol, E., 1927: Über die Bewegung mit Schleimbildung bei einigen Desmidiaceen aus der Hohen Tatra. Fol. Krypt. 1, 5.
Kopetzky-Rechtperg, O., 1931 a: Über die Kristalle in den Zellen der Gattung *Closterium Nitsch.* Beih. Bot. Zentralbl. 47, I. Abt., 291.
— 1931 b: Die „Zersetzungskörperchen" der Desmidiaceenzelle. Arch. f. Protistenkunde 75, 270.
— 1932: Die Nucleolen im Kern der Desmidiacee. Beih. Bot. Zentralblatt 49, I. Abt., 686.
— 1938: Mitteilungen über eine Plasmastruktur der Desmidiale *Netrium Digitus* und über einige Inhaltskörper dieser Alge. Protopl. 31, 607.
— 1949: Zellbau und Zelleinschlüsse bei Conjugaten, bes. Desmidiales. Protopl. 39, 106.
Krebs, I., 1951: Beiträge zur Kenntnis des Desmidiaceen-Protoplasten. I. Osmotische Werte. II. Plastidenkonsistenz. Sitzungsber. d. Österr. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, 160. Bd., 579.
— 1952: Beiträge zur Kenntnis der Desmidiaceen-Protoplasten. III. Permeabilität für Nichtleiter. Sitzungsber. d. Österr. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, 161. Bd., 291.
Krieger, W., 1937: Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der außereuropäischen Arten. Rabenhorst's Kryptogamenflora 13, Abt. 1.
Küster, E., 1937: Pathologie der Pflanzenzelle, II. Teil, Plastiden. Protoplasmamonographien, Bd. 13.
— 1937 c. Anisotrope Plastiden. Zeitschr. f. wiss. Mikr., Bd. 54, 68.
Löw, E., 1878: Bericht... Bot. Ztg. 36.
Lütkemüller, J., 1894: Die Poren der Desmidiaceen-Gattung *Closterium.* Österr. Bot. Ztg. 44.
— 1902: Die Zellmembran der Desmidiaceen. Beitr. z. Biol. d. Pfl., Bd. 8, 347.
Loub, W., 1951: Über die Resistenz verschiedener Algen gegen Vitalfarbstoffe. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., 160, 829.
— 1953: Zur Algenflora der Lungauer Moore. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl. (im Druck).
Menke, W., 1934 a: Chloroplastenstudien. Protopl. 21, 279.
— 1934 b: Chloroplastenstudien 2. Mitt. Protopl. 22, 56.
Molisch, H., 1917: Das Plasmamosaik der Raphidenzellen der Orchideen *Haemaria* und *Anoectochilus.* Sitzungsber. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 126. Bd., Heft 4 u. 5.
Nägeli, C., 1849: Gattungen einzelliger Algen physiologisch und systematisch bearbeitet. Neue Denkschr. d. allgem. Schweiz. Ges. f. d. ges. Naturwiss. Bd. 10.
Schröder, B., 1902: Untersuchungen über die Gallertbildungen der Algen. Verh. d. naturhist.-med. Ver. Heidelberg. N. F. 7, 139.
Schulze, O., 1907: Über den Bau und die Bedeutung der Außencuticula der Amphibienlarven. Arch. f. mikr. Anat. etc., 69. Bd., 544.
Strugger, S., 1936: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protopl. 26, 56.
— 1940 b: Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protopl. 44, 601.
— 1949 b: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin—Göttingen—Heidelberg.
Weber, F., 1930 a: Vakuolenkontraktion vitalgefärbter *Elodea*-Zellen. Protopl. 9, 106.
— 1930 b: Vakuolen-Kontraktion, Tropfenbildung und Aggregation in Stomata-Zellen. Protopl. 9, 128.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Weber, 1930 c: Vakuolenkontraktion und Vitalfärbung in Blütenzellen. Protopl. 11, 312.
— 1937: Die Doppelbrechung der Chloroplasten. Protopl. 27, 280.
West, W. and G. S., 1904—1912: A Monograph of the British Desmidiacae, Vol. I—IV. London.
West, G. S. and Carter, N., 1923: Id. Vol. V. London.
Wisselingh, C. van, 1912: Über die Zellwand von *Closterium*. Zeitschr. f. Bot. 4, 337.
— 1924: Die Zellmembran. Linsbauers Handbuch d. Pflanzenanatomie III/2.